

Universidad Autónoma de Madrid
Departamento de Bioquímica

**PAPEL DE LA PROTEÍNA PARKINA EN LA
FUNCIÓN CELULAR DE LAS NEURONAS
DOPAMINÉRGICAS. SUSCEPTIBILIDAD A LA
MUERTE CELULAR**

Jaime Menéndez- Cuervo Hurlé

Madrid, 2006

Departamento de Bioquímica
Facultad de Medicina
Universidad Autónoma de Madrid

**PAPEL DE LA PROTEÍNA PARKINA EN LA FUNCIÓN CELULAR
DE LAS NEURONAS DOPAMINÉRGICAS. SUSCEPTIBILIDAD A
LA MUERTE CELULAR**

Tesis realizada por: Jaime Menéndez- Cuervo Hurlé. Licenciado en Biología.

Directora de Tesis: María Ángeles Mena Gómez

Hospital Ramón y Cajal. Departamento de Investigación. Servicio de Neurobiología. Unidad de Neurofarmacología. Madrid.



HOSPITAL RAMON Y CAJAL
Unidad de Neurofarmacología
Servicio de Neurobiología
Departamento de Investigación

Carretera de Colmenar, km 9,100
28034 Madrid SPAIN
Tfno: +34-91 336 8384
Fax: +34-91 336 9016

Madrid, 5 de Septiembre de 2006

La Dra. M^a Ángeles Mena, facultativo del Servicio de Neurobiología del Departamento de Investigación del Hospital Ramón y Cajal y directora del trabajo de investigación de la tesis doctoral: "Papel de la proteína parkina en la función celular de las neuronas dopaminérgicas. Susceptibilidad a la muerte celular".

AUTORIZA:

A D. Jaime Menéndez- Cuervo Hurlé a la presentación de su tesis doctoral en el Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Madrid.

Dra. M.A. Mena
e-mail: maria.a.mena@hrc.es

A mis padres

Gracias por todo

Quiero agradecer a la Dra. María Ángeles Mena el haberme ofrecido la posibilidad de realizar este trabajo, de disfrutar de la Investigación y de la infinita paciencia que ha tenido conmigo. ¡Muchas gracias!

Agradezco a la Dra. Ana Aranda por acceder a la tutela de la tesis doctoral.

Mi más sincero agradecimiento a mis compañeras y, sobre todo, amigas durante todo este proceso, M^a José y Rosa. Gracias porque me enseñasteis todo lo que se, por vuestros consejos y apoyo incondicional. Por aguantarme. Porque sois lo mejor, como compañeras de trabajo y más como personas. Sin vosotras no hubiera sido posible. ¡Muchísimas gracias!

También al otro hombre del laboratorio, Jose porque, además de no hacerme sentir solo como exponente del género masculino, siempre estaba ahí para ofrecerme su ayuda y amistad.

Gracias Sonso, porque estuvo presente en los inicios de este camino y, aunque luego ausente, siempre estuviste ahí para ayudarme en todo, para escuchar mis penas y compartir mis alegrías. Te llevo en mi corazón.

Gracias a Charito, por supuesto. Me llevo una amiga para siempre. Gracias por tener siempre una sonrisa para mi y por tu apoyo.

Al resto de la gente del labo: Mati, Ana, Izaskun. Porque con vosotras da gusto trabajar y porque creasteis un ambiente estupendo! Así da gusto!

Gracias de todo corazón al Dr. Paíno y la Nuri. Este trabajo también os debe mucho a vosotros. Por todo: el café de las mañanas, nuestras charlas científicas y no tan científicas, por darme fuerzas para seguir cada día y contagiarme vuestra ilusión. Gracias en definitiva por vuestra amistad. También gracias a Pili.

Si alguien fue vital para que llegase a buen puerto este trabajo, esa persona fue la Silvi! Gracias por todo tu apoyo, tanto logístico como afectivo, jajaja. Por estar ahí siempre!

Gracias a Paco. Por ser el mejor compañero de fatigas y mejor amigo.

Gracias a María, también sufridora de mi carácter y amiga.

Gracias a la Dra. Bazán. Otra gran amiga. Una de las mejores personas que me he encontrado en este camino.

Muchas gracias al resto de la gente del pasillo.

Muchísimas gracias a Julia. Es la persona que más ha aguantado mis alegrías y frustraciones durante muchos años. Te estaré eternamente agradecido por todo lo que me has dado. Te quiero y siempre te querré.

Muchas gracias a mis muy mejores amigos: Mono, Cholo, Rata, Topo, Olay, Mori, Iván, Llavo, Tonoki, Picotas, Padilla! Muchas gracias por ser mis amigos. Mención especial para Mono, Cholo, Olay, Michi y Padilla por sufrirme en Madrid. Que bien me lo paso con todos vosotros coño! Os quiero! Puxa Asturias!

No me olvido de vosotras: Anina (que paciencia tienes conmigo!!!), Pola, Carmen, Cris, Elena, Martu, Inés. Tampoco esto hubiera sido posible sin vosotras. Os quiero un montón. Puxa!

Turno para el Athletic Club: Daniel, Fer, Juanjo, Michel, Julito, Bochat, Pol, Ignacio. Mi más sincero agradecimiento por acogerme entre vosotros y disfrutar del fútbol pero sobre todo del circo que tenis montado, jejejeje!

Muchas gracias a mi familia por su apoyo: mi padre, en primer lugar, por aguantarme y darme todo, mis hermanos Fernando y Koke. A mis tíos Chema y Yolanda y primos Miguel, Alvaro y Ana. Muchísimas gracias abuelita!!! Un agradecimiento especial para mis tíos Tito y Ángeles y a mi primo, ya hermano, Daniel por acogerme en vuestra casa y ser siempre tan cariñosos conmigo. Os quiero mucho a todos.

Por último te tengo que dar las gracias a ti, mamá. Ya sabes que te quiero y que te querré siempre. Me gustaría que estuvieras aquí conmigo. Te echo muchísimo de menos... Te debo todo lo que soy. Te quiero mamá.

RESUMEN

Las mutaciones del gen *park-2*, una de las mutaciones más frecuentes en la enfermedad de Parkinson, se asocian a un trastorno de función de la proteína parkina y a una alteración de la función celular que en las neuronas dopaminérgicas conlleva un aumento del metabolismo de la dopamina, de la producción de radicales libres y mayor susceptibilidad a los estímulos que producen estrés celular y a los agentes ambientales y farmacológicos que potencian estos mecanismos patógenos.

Para estudiar el papel de la proteína parkina en la supervivencia y muerte de las neuronas dopaminérgicas trabajamos con un modelo de ratón nulo para el gen *park-2* realizando estudios “in vitro” con cultivos fetales mesencefálicos enriquecidos en neuronas y modelos “in vivo”.

Mediante los experimentos “in vitro”, en los que tratamos los cultivos con agentes neurotóxicos como son la L-DOPA, donadores de óxido nítrico e inhibidores de la producción de energía como la rotenona, hemos observado que los cultivos procedentes de ratones nulos para la proteína parkina son resistentes a la toxicidad inducida por la L-DOPA y DEA/NO y más sensibles a la rotenona y tienen unos niveles de glutatión mayores que los de los cultivos salvajes y que este es un sistema de compensación frente a la producción de radicales libres. Además, los cultivos procedentes de ratones nulos para el gen *park-2* son más sensibles a la inactivación de la producción de energía mediante el tratamiento con rotenona.

Con el estudio “in vivo” en el que tratamos los ratones con cinnarizina, que es un antagonista de los canales de Ca^{2+} que induce parkinsonismo en humanos, vemos que los ratones nulos para la proteína parkina son más susceptibles a los efectos acinéuticos de la cinnarizina y al aumento de la expresión de proteínas proapoptóticas.

ABSTRACT

Mutations in the *park-2* gene, one of the most common mutations in familial Parkinson's disease, are associated to disorders in the parkin protein function and produce alterations in dopaminergic neurons function that enhance an increase in susceptibility to stimuli which cause cell stress and to environmental and pharmacological agents that potentiate such pathogen mechanisms.

In order to study the role of the parkin protein in the dopaminergic neurons survival or death, we use a transgenic mouse with the *park-2* gene deleted and we perform “in vitro” studies, with neuronal enriched fetal mesencephalic cultures, and “in vivo” studies.

We treated mesencephalic cultures with neurotoxic agents such as L-DOPA, nitric oxide donors and inhibitors of the energy production such as rotenone and we found that cultures from knock-out mice are more resistant to L-DOPA- and DEA/NO-induced toxicity and have increased glutathione levels than wild type mice and this is a compensatory mechanism against the free radical production. Furthermore, cultures from knock-out mice are more susceptible to the energy production inactivation which is enhanced with the treatment with rotenone.

“In vivo” studies consisted in mice treatment with cinnarizine, an antagonist of Ca^{2+} channels that induces parkinsonism in humans, and we demonstrated that knock-out mice are more susceptible to the akinetic effects of cinnarizine and to the increased expression of apoptotic proteins.

ÍNDICE:

I. INTRODUCCIÓN.....	pag. 19
1. Enfermedad de Parkinson.....	pag. 20
1.1 Definición.....	pag. 20
1.2 Etiología.....	pag. 20
1.2.1 Factores ambientales.....	pag. 20
1.2.2 Factores genéticos.....	pag. 21
2. Genética de la enfermedad de Parkinson.....	pag. 21
2.1 Genes implicados en la enfermedad de Parkinson.....	pag. 21
2.1.1 α - sinucleína.....	pag. 21
2.1.2 Receptor nuclear-1.....	pag. 22
2.1.3 park-2.....	pag. 22
2.1.4 DJ-1.....	pag. 22
2.1.5 Gen codificante para la hidrolasa de ubiquitina C-terminal L1.....	pag. 22
2.1.6 Neurofilamento medio.....	pag. 23
2.1.7 Otros loci.....	pag. 23
2.2 Gen park-2.....	pag. 24
2.2.1 Características y funciones.....	pag. 24
2.2.2 Sustratos de la parkina.....	pag. 27
3. Modelo de ratones mutantes para el gen park-2.....	pag. 28
II. OBJETIVOS.....	pag. 34
III. MATERIALES Y MÉTODOS.....	pag. 36
1. Materiales y reactivos.....	pag. 37
1.1 Cultivos celulares.....	pag. 37
1.2 Reactivos de técnicas metodológicas.....	pag. 38
1.3 Reactivos de tratamientos farmacológicos en cultivos celulares...	pag. 39
1.4 Reactivos para inmunocitoquímica.....	pag. 40
1.5 Reactivos para Western Blot.....	pag. 40
1.6 Anticuerpos.....	pag. 41

2. Métodos	pag. 42
2.1 Cruce y genotipado de los ratones salvajes y mutantes para el gen de la parkina	pag. 42
2.2 Experimentos “in vitro”	pag. 43
2.2.1 Cultivos primarios neuronales mesencefálicos de ratones WT y PK-KO.....	pag. 43
2.2.1a Cultivos primarios neuronales de mesencéfalo de embrión (E13) de ratones WT y PK-KO.....	pag. 43
2.2.1b Cultivos enriquecidos en neuronas.....	pag. 44
2.2.1c Cultivos enriquecidos en astrogliá.....	pag. 44
2.2.1d Cultivos enriquecidos en microglía.....	pag. 44
2.2.2 Caracterización inmunocitoquímica.....	pag. 44
2.2.2a Caracterización de los distintos tipos celulares.....	pag. 44
2.2.2b Métodos inmunocitoquímicos.....	pag. 45
2.2.2c Valoración del área ocupada por astrocitos (GFAP ⁺) y neuronas (MAP-2 ⁺).....	pag. 46
2.2.2d Cuantificación de células para cada anticuerpo.....	pag. 46
2.2.3 Ensayos de viabilidad celular.....	pag. 46
2.2.3a Actividad mitocondrial.....	pag. 46
2.2.4 Ensayos de muerte celular programada o apoptosis.....	pag. 47
2.2.4a Condensación y fragmentación de la cromatina.....	pag. 47
2.2.4b Técnica de TUNEL.....	pag. 47
2.2.5 Ensayos de muerte por necrosis.....	pag. 47
2.2.5a Actividad lactato deshidrogenasa.....	pag. 47
2.2.5b Ensayos de exclusión por azul-tripán.....	pag. 47
2.2.6 Análisis de nitritos.....	pag. 47
2.2.7 Análisis de la concentración de glutatión.....	pag. 48
2.2.8 Captación de alta afinidad para [³ H]-dopamina.....	pag. 48
2.2.9 Captación de alta afinidad para [³ H]-GABA.....	pag. 49
2.2.10 Electroforesis, transferencia e inmunodetección de proteínas..	pag. 49
2.2.11 Determinación de proteínas.....	pag. 50
2.2.12 Determinación de monoaminas en los cultivos mesencefálicos.....	pag. 50

2.3 Experimentos “in vivo”	pag. 50
2.3.1 Animales utilizados y tratamiento.....	pag. 50
2.3.2 Estudios de comportamiento.....	pag. 51
2.3.3 Obtención de las regiones cerebrales y preparación del tejido.....	pag. 51
2.4. Determinación de monoaminas y sus metabolitos	pag. 51
2.5. Análisis estadístico de los datos	pag. 52
IV. RESULTADOS	pag. 53
1. Caracterización de los cultivos enriquecidos en neuronas mesen- cefálicos fetales (E13) primarios	pag. 56
2. Efectos diferenciales de la L-DOPA en el metabolismo de las mono- aminas, la supervivencia celular y la producción de glutathione de los cultivos enriquecidos en neuronas de ratones WT y PK-KO	pag. 58
2.1 Efectos de la L- DOPA sobre la supervivencia y muerte de las neuronas dopaminérgicas.....	pag. 58
2.2 Estudio de las vías implicadas en la muerte celular inducida por la L-DOPA.....	pag. 60
2.3 Valoración de los niveles de L-DOPA, dopamina y actividad monoamino oxidasa en los cultivos mesencefálicos WT y PK-KO tratados con L-DOPA.....	pag. 62
2.4 Efecto del tratamiento con L-DOPA sobre los niveles intracelulares de glutathione.....	pag. 63
2.5 Efecto de la inhibición de la síntesis de glutathione en el tratamiento de los cultivos WT y PK-KO con L-DOPA.....	pag. 64
3. Los cultivos procedentes de ratones PK-KO son resistentes a la toxicidad inducida por el óxido nítrico	pag. 65

3.1 Efectos diferenciales del DEA/NO sobre la supervivencia y muerte de las neuronas dopaminérgicas.....	pag. 65
3.2 Patrón del fenotipo celular afectado por el DEA/NO en los cultivos mesencefálicos.....	pag. 66
3.3 Estudio de las rutas intracelulares implicadas en la muerte celular inducida por el DEA/NO.....	pag. 70
3.4 Efecto del DEA/NO sobre la homeostasis del glutathione.....	pag. 70
3.5 La inhibición de la síntesis de glutathione suprime los efectos diferenciales del DEA/NO.....	pag. 73
 4. Efecto de la rotenona, un inhibidor de la cadena respiratoria mitocondrial, en los cultivos mesencefálicos fetales primario.....	 pag. 78
4.1 Efectos de la rotenona sobre la supervivencia de las neuronas dopaminérgicas y la muerte celular en los cultivos mesencefálicos...	pag. 78
4.2 Patrón del fenotipo celular afectado por la rotenona en los cultivos mesencefálicos.....	pag. 80
4.3 Estudio de las posibles rutas implicadas en los efectos tóxicos de la rotenona sobre los cultivos mesencefálicos primarios procedentes de ratones PK-KO.....	pag. 83
4.3.1 La activación de las vías de la COX y de la NOS no están involucradas en los efectos tóxicos inducidos por la rotenona.....	pag. 83
4.3.2 La inactivación de la NADPH oxidasa protege a las neuronas dopaminérgicas de la muerte inducida por la rotenona en los cultivos PK-KO.....	pag. 84
4.3.3 Estudio de la vía de las MAPK.....	pag. 86
4.3.4 Implicación de la vía de las caspasas.....	pag. 86
4.4 La inhibición de la activación de la microglía protege de la muerte celular inducida por la rotenona.....	pag. 88
4.5 La adición de microglía procedente de cultivos PK-KO a los cultivos WT incrementa la muerte de las neuronas dopaminérgicas inducida por la rotenona.....	pag. 90

5. Modelo “in vivo”: efectos de la cinarizina, un antagonista del calcio que produce parkinsonismo en humanos, sobre los ratones mutantes para el gen <i>park-2</i>.....	pag. 91
5.1 Efectos de la cinarizina sobre el consumo de agua, comida y peso de los ratones.....	pag. 91
5.2 Efectos de la cinarizina sobre el comportamiento.....	pag. 92
5.3 Efectos de la cinarizina sobre el metabolismo de las monoaminas...	pag. 93
5.4 Efectos de la cinarizina sobre el metabolismo del glutatión.....	pag. 98
5.5 Efectos de la cinarizina sobre la expresión de marcadores neuronales y gliales.....	pag. 98
5.6 Efectos de la cinarizina sobre la expresión de marcadores de supervivencia y muerte neuronal.....	pag. 101
V. DISCUSIÓN.....	pag. 102
1. Efectos diferenciales de la L-DOPA sobre el metabolismo de las monoaminas, la supervivencia celular y la producción de GSH de los cultivos enriquecidos en neuronas de ratones WT y PK-KO....	pag. 103
2. Los cultivos procedentes de ratones PK-KO son resistentes a la toxicidad inducida por un donador de óxido nítrico (DEA/NO).....	pag. 104
3. Efectos de la rotenona, un inhibidor de la cadena respiratoria mitocondrial, en cultivos neuronales mesencefálicos primarios procedentes de ratones WT y PK-KO.....	pag. 106
4. Modelo “in vivo”: efectos de la cinarizina, un antagonista del calcio que produce parkinsonismo en humanos, sobre los ratones mutantes para el gen <i>park-2</i>.....	pag. 109
5. Papeles de la proteína parkina en neuroprotección.....	pag. 111
5.1 Papel de la proteína parkina como E3 ubiquitin ligasa. Interacción con otras proteínas.....	pag. 111
5.2 Papel de la proteína parkina en la regulación de la expresión génica.....	pag. 114
VI. CONCLUSIONES.....	pag. 115

VII. BIBLIOGRAFÍA.....	pag. 117
ANEXO.....	pag. 135

ÍNDICE DE FIGURAS:

Figura 1. Estructura modular del gen <i>park- 2</i>	pag. 24
Figura 2. Sistema de ubiquitinización del proteasoma.....	pag. 25
Figura 3. Inactivación del gen <i>park- 2</i>	pag. 29
Figura 4. Marcadores proteicos de neuronas dopaminérgicas en ratones WT y PK-KO.....	pag. 30
Figura 5. Los ratones PK-KO tienen un incremento significativo en los niveles de GSH respecto a los ratones WT.....	pag. 31
Figura 6. Los ratones PK-KO tienen una liberación de ³ H-DA basal e inducida por KCl normal, pero tienen una menor liberación de ³ H-DA inducida por anfetamina.....	pag. 32
Figura 7. Cascada apoptótica inducida por DA.....	pag. 54
Figura 8. Caracterización celular de los cultivos mesencefálicos fetales primarios enriquecidos en neuronas procedentes de ratones salvajes (WT) y mutantes para la parkina (PK-KO).....	pag. 57
Figura 9. Efectos de la L-DOPA sobre neuronas DAérgicas y muerte celular apoptótica en cultivos mesencefálicos WT y PK-KO.....	pag. 59
Figura 10. Rutas de señalización implicadas en los efectos de la L-DOPA sobre los cultivos WT y PK-KO.....	pag. 61

Figura 11. Niveles de L-DOPA, DA, DOPAC y actividad MAO en cultivos mesencefálicos WT y PK-KO tratados con L-DOPA.....	pag. 62
Figura 12. Niveles de GSH intracelular en los cultivos mesencefálicos primarios de WT y PK-KO.....	pag. 63
Figura 13. La inhibición de GSH bloquea la respuesta diferencial frente a L-DOPA de los cultivos WT y PK-KO.....	pag. 64
Figura 14. Efectos del DEA/NO sobre las neuronas DAérgicas y la muerte celular de los cultivos mesencefálicos.....	pag. 67
Figura 15. Efecto del DEA/NO sobre la muerte de las neuronas de los cultivos mesencefálicos de ratones WT.....	pag. 68
Figura 16. Efectos del tratamiento con DEA/NO sobre las células gliales.....	pag. 69
Figura 17. Señales de muerte celular implicadas en la muerte de los cultivos WT inducida por DEA/NO.....	pag. 71
Figura 18. Niveles intracelulares de GSH y GSNO en cultivos WT y PK-KO.....	pag. 72
Figura 19. La inhibición de la síntesis de GSH bloquea la respuesta diferencial al tratamiento con DEA/NO en los cultivos WT y PK-KO.....	pag. 74
Figura 20. La inhibición de la síntesis de GSH bloquea también la respuesta diferencial inducida por el tratamiento con DEA/NO sobre las células gliales.....	pag. 75
Figura 21. La depleción moderada de GSH también suprime los efectos diferenciales inducidos por DEA/NO en los cultivos WT y PK-KO.....	pag. 76
Figura 22. El dietil maleato (DEM) suprime los efectos diferenciales inducidos por el tratamiento con DEA/NO en cultivos WT y PK-KO.....	pag. 77
Figura 23. Efectos de la rotenona sobre las neuronas DAérgicas y la muerte celular de los cultivos mesencefálicos WT y PK-KO.....	pag. 79

Figura 24. La rotenona induce apoptosis y necrosis en los cultivos PK-KO pero no en los WT.....	pag. 81
Figura 25. Efectos de la rotenona sobre la población de las células gliales de los cultivos WT y PK-KO.....	pag. 82
Figura 26. Los inhibidores de las rutas de la COX y de la NOS no protegen de la toxicidad inducida por la rotenona en los cultivos PK-KO.....	pag. 84
Figura 27. La inactivación de la NADPH oxidasa protege a las neuronas DAérgicas de la muerte inducida por la rotenona en los cultivos PK-KO.....	pag. 85
Figura 28. Estudio de la vía de las MAPK en la muerte inducida por rotenona en los cultivos PK-KO.....	pag. 86
Figura 29. Estudio de la vía de las caspasas en la muerte inducida por rotenona en los cultivos PK-KO.....	pag. 87
Figura 30. La minociclina previene la muerte celular inducida por dosis bajas de rotenona en cultivos PK-KO.....	pag. 89
Figura 31. La adición de microglía PK-KO induce la muerte de las neuronas DAérgicas en un cultivo WT al tratarlo con dosis bajas de rotenona.....	pag. 90
Figura 32. Fotografía de un ratón control WT (A) y un knock-out para el gen <i>park-2</i> tratado con cinarizina (B).....	pag. 92
Figura 33. Efecto de la cinarizina sobre el peso corporal y la actividad motora de los ratones WT y PK-KO.....	pag. 93
Figura 34. Efectos de la cinarizina sobre las actividades MAO y COMT en ratones WT y PK-KO.....	pag. 97
Figura 35. Efecto de la cinarizina sobre marcadores de estrés oxidativo en ratones WT y PK-KO.....	pag. 98

Figura 36. Expresión de marcadores neuronales en ratones controles y tratados con cinarizina.....	pag. 99
Figura 37. Expresión de marcadores gliales en ratones controles y tratados con cinarizina.....	pag. 100
Figura 38. Expresión de marcadores de muerte celular en ratones controles y tratados con cinarizina.....	pag. 101

ABREVIATURAS:

³ H-DA	Dopamina tritiada
³ H-GABA	Ácido γ -aminobutírico tritiado
3- MT	3-metoxi-tiramina
5- HIAA	5-hidroxi-indol-acético
5- HT	Serotonina
6-OH-DA	6-hidroxi-dopamina
AMPc	Adenosín 5' 3' monofosfato cíclico
ANOVA	Análisis de la varianza
AR-JP	Parkinsonismo juvenil autosómico recesivo
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
BSA	Seroalbúmina bovina
BSO	L-butionina-(S,R)-sulfoximina
COX	Enzima ciclo-oxigenasa
DA	Dopamina
DAB	Diaminobenzidina

DAérgicas	Dopaminérgicas
DAT	Transportador de Dopamina
DEA/NO	Dietilamina/complejo sódico de óxido nítrico
DIV	Días “in vitro”
DMEM	Medio de cultivo Eagle modificado por Dulbecco
DOPA	Dihidroxifenilalanina
DOPAC	Ácido 3,4- Dihidroxi-fenil-acético
DTNB	5.5´-ditiobis (2-ácido nitrobenzóico)
E13	Embriones de 13 días
EP	Enfermedad de Parkinson
ERK	Proteína quinasa regulada por señales extracelulares
FCI	Fenol: cloroformo: alcohol isoamílico
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
GABA	Ácido γ -aminobutírico
GFAP	Proteína ácida fibrilar de la glía
GMPc	Guanosín 5´3`monofosfato cíclico
GPx	Glutation peroxidasa
GR	Glutation reductasa
GSH	Glutation reducido
GSNO	S- nitrosoglutation
GSSG	Glutation oxidado
GSx	Glutation total
HPLC	Cromatografía líquida de alta presión
HVA	Ácido homovanílico
LDH	Enzima Lactato deshidrogenasa
L-DOPA	L-3,4-Dihidroxifenilialanina

L-NAME	N- nitro- L- arginina metil ester
LPS	Lipopolisacárido
MAO	Enzima mono-amino-oxidasa
MAO-B	Enzima mono-amino-oxidasa B
MAP- 2	Proteína asociada a microtúbulos
MAPK	Proteína quinasa activada por mitógenos
MCG	Medio condicionado de glía
MPTP	1-metil-4-fenil-1, 2,3,6 tetrahidropiridina
MTT	Ensayo de actividad mitocondrial
NA	Noradrenalina
NADPH	Nicotiamida-Adenina Dinucleotido fosfato
NF-M	Neurofilamento medio
NO	Óxido nítrico
NOSi	Óxido nítrico sintasa inducible
PBS	Tampón fosfato salino
PCA	Ácido perclórico
PI3K	Fosfatidil inositol 3 quinasa
PFA	Para-formaldehido
PK-KO	Ratones nulos para el gen <i>park- 2</i>
ROS	Especies reactivas del oxígeno
SNpc	<i>Substantia nigra</i> pars compacta
TH	Tirosina hidroxilasa
UCH-L1	Hidrolasa de ubiquitina C- terminal L1
WT	Ratones salvajes

I. INTRODUCCIÓN

1. ENFERMEDAD DE PARKINSON

1.1 Definición

La enfermedad de Parkinson (EP) fue descrita por primera vez por James Parkinson en 1817. Es la segunda enfermedad neurodegenerativa más común en el mundo después de la enfermedad de Alzheimer, con una incidencia del 1 % de la población que supera los cincuenta años (Polymeropoulos et al., 1996). Los signos y síntomas de la enfermedad de Parkinson aparecen de forma progresiva y sólo son aparentes cuando la concentración de dopamina (DA) en el estriado ha disminuido hasta un 80%. Los síntomas más comunes que presentan los pacientes parkinsonianos son: bradiquinesia, temblor, rigidez e inestabilidad.

La característica más importante en la EP es la pérdida selectiva de las neuronas dopaminérgicas (DAérgicas) de la parte ventral de la sustancia nigra del mesencéfalo, lo que conduce a una reducción importante de los niveles de dopamina en la región del estriado, fundamentalmente en su parte dorsal (núcleo caudado y putamen).

Entre las posibles causas establecidas que precipitan la pérdida neuronal en la enfermedad de Parkinson están: la disminución de la actividad del complejo I de la cadena respiratoria mitocondrial, el aumento de la peroxidación lipídica, la disminución en el contenido de glutatión, el aumento de óxido nítrico (NO), de la enzima óxido nítrico sintasa (NOS), la disminución de la actividad de la glutatión peroxidasa (GPx), y el aumento del contenido de hierro en las neuronas DAérgicas (Jenner and Olanow, 1996).

1.2 Etiología.

Hasta la fecha no ha sido posible identificar un único elemento causal en el origen etiológico de la enfermedad de Parkinson. La tendencia mayoritaria es a considerar la existencia de factores genéticos que predisponen a padecer la enfermedad y la suma de factores ambientales como desencadenantes del proceso de muerte neuronal.

1.2.1 Factores ambientales.

Entre los factores ambientales que pueden influir en el desarrollo de la enfermedad de Parkinson se han descrito: la exposición de los individuos a toxinas (neurotoxinas) que incrementan los radicales libres o que producen una disfunción mitocondrial; el tratamiento con drogas farmacológicas como antiarrítmicos, antagonistas de los canales de calcio, estrógenos, etc.; la exposición a agentes infecciosos que pueden dañar el sistema nervioso y otros agentes externos (Allam et al., 2005). Estos factores pueden inducir la aparición de EP esporádica, en la que no se conocen los

mecanismos patológicos, en individuos con antecedentes familiares de EP y otras enfermedades neurodegenerativas.

1.2.2 Factores genéticos.

Desde la observación de Gowers de que, aproximadamente, en el 15 % de sus pacientes que padecían EP, algún miembro de la familia estaba afectado por esta enfermedad (Gowers, 1902), el papel de los factores genéticos en la EP ha sido sujeto de una intensa investigación.

Hasta la fecha, se han identificado distintas mutaciones en varios genes como responsables de las distintas formas familiares de la enfermedad: α -sinucleína, *park-2*, DJ-1, PINK-1 y LRRK2 (Cookson et al., 2005).

Podemos considerar dos formas para encontrar posibles genes implicados en la aparición de la EP. Una de estas formas se basa en un rastreo randomizado del genoma para detectar un posible ligamiento genético usando métodos no paramétricos. La otra forma de detectar posibles genes implicados en la enfermedad de Parkinson es la del gen candidato, basado en el conocimiento de la patología de la enfermedad (Wood, 1998).

También existen estudios que sugieren la existencia de polimorfismos en genes que están implicados en el metabolismo de la dopamina y su transporte, en la homeostasis del hierro, en la inflamación, en la existencia de anomalías en la mitocondria y en el metabolismo de toxinas exógenas o endógenas, que pueden jugar un papel importante en la predisposición individual a la aparición de la enfermedad de Parkinson (Gao et al., 2003b; Andersen, 2004; Palacino et al., 2004; Jenner and Olanow, 2006).

2. GENÉTICA DE LA ENFERMEDAD DE PARKINSON.

2.1 Genes implicados en la enfermedad de Parkinson (Tabla 1).

2.1.1 α -sinucleína.

Fue el primer gen descubierto ligado a la enfermedad de Parkinson (Golbe et al., 1990). La α -sinucleína es una proteína soluble de 140 aminoácidos con una función desconocida. Es abundante en las neuronas y está especialmente concentrada en las terminales presinápticas. Esta proteína es una chaperona que juega un papel importante en la mediación de las interacciones proteína-proteína y proteína-lípido. Se han identificado varias proteínas asociadas a la función de α -sinucleína: sinfilina-1 (modulador de los procesos neuropatológicos de la EP que interacciona físicamente con la α -sinucleína), tubulina (proteína globular responsable de la formación de los microtúbulos),

proteína tau asociada a microtúbulos, 14-3-3 y otras proteínas de unión tipo 14-3-3, Bcl- 2 (proteína anti-apoptótica) y la forma no fosforilada de la proteína tirosina hidroxilasa (TH), enzima limitante en la síntesis de dopamina.

2.1.2 Receptor nuclear-1 (*nurr1*).

nurr1 es un gen requerido en la diferenciación y el mantenimiento de las neuronas dopaminérgicas. El gen *nurr1* contiene ocho exones y tiene un tamaño de 8,3 kb (Ichinose et al., 1999). Este receptor está involucrado en la regulación de la liberación de la hormona corticotropina y en las respuestas inflamatorias. Además, las mutaciones en el gen afectan a la transcripción de los genes que codifican para la tirosina hidroxilasa y el transportador de dopamina (DAT).

2.1.3 *park-2*.

El gen *park-2* se asocia a la forma recesiva juvenil de la EP y codifica para la proteína parkina. Trataremos de él con detalle más adelante.

2.1.4 *DJ-1*.

Este gen se identificó en el año 2003 casualmente asociado a la forma recesiva juvenil de la EP. *DJ-1* contiene ocho exones y codifica para una proteína de 189 aminoácidos. En el cerebro, la expresión de *DJ-1* es ubicua, con mayores niveles de transcripción en las regiones subcorticales que son las que están afectadas normalmente en la enfermedad de Parkinson (Bonifati et al., 2003). Entre las características más importantes de esta proteína destacan: interacciona con c-Myc, factor de transcripción que regula la proliferación celular, e incrementa la transformación celular en presencia de Myc o h-Ras, una proteína importante en la transducción de señales, y también interacciona con una proteína inhibidora de la señal de activación de transducción y activación de la transcripción.

2.1.5 Gen codificante para la hidrolasa de ubiquitina C-terminal L1 (UCHL1).

Este gen se identificó en una única familia de Alemania (Leroy et al., 1998). UCHL1 es una diana mayoritaria en el daño oxidativo y está implicada tanto en la enfermedad de Parkinson como en la de Alzheimer. UCHL1 hidroliza pequeños fragmentos de la región C-terminal de proteínas ubiquitinizadas, liberando monómeros de ubiquitina, siendo así un componente importante del sistema del proteasoma. El gen UCHL1 tiene un tamaño de 10 kb y nueve exones codificantes. Además de en la

enfermedad de Parkinson, UCHL1 se ha relacionado con otras dos enfermedades neurodegenerativas: la ataxia espinocerebelar y la enfermedad de Huntington.

2.1.6 Neurofilamento medio (NF-M).

El citoesqueleto neuronal está formado por proteínas neurofilamentosas, que son importantes para el transporte axónico y la estabilidad celular. La regulación a la baja del ARN mensajero que codifica para los NF-M y el acúmulo de la forma hiperfosforilada de estos neurofilamentos son características comunes de la enfermedad de Parkinson y de Alzheimer (Kittur et al., 1994; Julien and Mushynski, 1998). Ciertas variantes anómalas del gen que codifica para NF-M incrementan la posibilidad de desarrollar EP y sugiere que el citoesqueleto juega un papel importante en el proceso de la enfermedad.

2.1.7 Otros loci.

En la tabla 1 vemos la lista de los loci involucrados en la enfermedad de Parkinson familiar y que han sido mapeados hasta la fecha. De todos ellos, hay cuatro loci desconocidos que se han asociado a múltiples familias europeas con EP. Uno de estos loci está asociado a una enfermedad de Parkinson de inicio temprano (*park-6*) mientras que los otros tres loci tienen un inicio tardío típico de la EP: *park-3*, *park-8* y *park-10*.

Forma	Tipo	Gen	Loc.	Patrón	C.Lewy	Clínica
PARK1	Mutación	α -Sinucleína	4q21	AD	Sí	Temprana-rápida-demencia
PARK2	Delec/Mutac	Parkin	6q25.2-27	AR	No?	Juvenil-lenta
PARK3 PARK4 PARK5 PARK6 PARK7 PARK8	Ligamiento Mutación Ligamiento Delec/Mut	SPR? UCHL1 PINK1 DJ-1 LRRK2	2p13 4p15 4p14 1p35 1p36 12p11.2-q34.1	AD AD AD? AR AR	Sí ? ? ?	Comienzo tardío 37-89 Temprana-lenta Temprana-lenta-distonía
PARK9 PARK10 PARK11	Mutaciones Mutación	Nurr1 NF-M	9q33-q34.1 1p32 2q36 2q22-23 8p21	 AD ?	 Sí	 Tardía Juvenil-demencia tardía

Tabla 1. Genes implicados en la enfermedad de Parkinson familiar.

2.2 Gen *park-2*.

2.2.1 Estructura y funciones del gen.

Como hemos comentado anteriormente, las mutaciones en el gen *park-2* producen un parkinsonismo juvenil autosómico recesivo (AR-JP), que es una forma familiar (genética) de la enfermedad de Parkinson. Las características de la AR-JP son: 1) La existencia de miembros de la familia afectados por la enfermedad; 2) Inicio temprano de la enfermedad; 3) Síndrome parkinsoniano con numerosos aspectos clínicos anormales; 4) Ausencia de cuerpos de Lewy en el cerebro.

El gen *park-2* consta de 12 exones separados por regiones intrónicas. Por esto, el tamaño del gen es de 1, 53 Mb, siendo uno de los mayores genes dentro del genoma humano (Kitada et al., 1998; West et al., 2001). *park-2* codifica para la parkina, una proteína de 465 aminoácidos y un peso molecular de 52 KD. La parkina es una proteína muy conservada a lo largo de la evolución, con proteínas similares en *Caenorhabditis elegans*, *Drosophila melanogaster*, ratón, rata y otras especies (Horowitz et al., 1999; Culetto and Sattelle, 2000; Kitada et al., 2000; Bae et al., 2003). Tiene una estructura modular (Fig. 1), conteniendo un dominio ubiquitina en la región N-terminal, una región central y dos dominios RING-finger en la región C-terminal. El promotor de *park-2* funciona bidireccionalmente de modo que regula la transcripción de este gen pero también de otro gen antisentido (West et al., 2003) que tiene un tamaño de 0.6 Mb, contiene cinco exones, y se le ha denominado gen corregulado de *park-2* (PACRG).



Figura 1. Estructura modular del gen *park-2*.

Las primeras mutaciones que llevaron a la identificación del gen *park-2* fueron grandes deleciones de uno o varios exones (Kitada et al., 1998). Desde entonces, se han identificado muchos tipos de mutaciones: deleciones de uno o varios exones, duplicaciones o triplicaciones de exones, mutaciones de cambio en la pauta de lectura, mutaciones puntuales, etc. La mayoría de las mutaciones puntuales se localizan en la región de los dominios RING-finger, lo que implica que esos dominios juegan un papel

fundamental en la función de la proteína. Las mutaciones en el gen de la parkina que se asocian a AR-JP se detectan tanto en homocigosis como en heterocigosis. De esta manera, la pérdida de una de las copias del gen constituye un factor de riesgo para el desarrollo de la enfermedad de Parkinson y esa pérdida de función es el mecanismo patológico predominante de la EP.

La proteína parkina, como otras proteínas con dominios RING-finger, funciona como una E3 ligasa (Shimura et al., 2000; Zhang et al., 2000). Las E3 ligasas son proteínas que forman parte de la maquinaria celular ligando otras proteínas con ubiquitina y marcándolas así para su degradación por el proteasoma. El sistema de degradación del proteasoma juega un papel fundamental en muchos procesos vitales para la célula y su disfunción se relaciona con las enfermedades neurodegenerativas (Ciechanover and Brundin, 2003; Giasson and Lee, 2003; Moore et al., 2003).

La ubiquitina es una proteína de 76 aminoácidos que se une covalentemente al extremo C-terminal de un sustrato. Esta unión covalente se produce por medio de la activación de una cascada enzimática en la que intervienen tres tipos de enzimas: enzimas E1 que activan la ubiquitina, E2 que conjugan la ubiquitina y E3 que ligan la ubiquitina al sustrato. En sucesivos ciclos de este proceso, varias moléculas de ubiquitina se unen al sustrato formando una cadena de poliubiquitina que es la señal que reconoce el proteasoma para proceder a la degradación del sustrato. El sustrato es degradado por el proteasoma y la cadena de poliubiquitina se recicla por medio de enzimas como la UCH-L1, que hidrolizan la cadena generando monómeros de ubiquitina (Fig. 2).

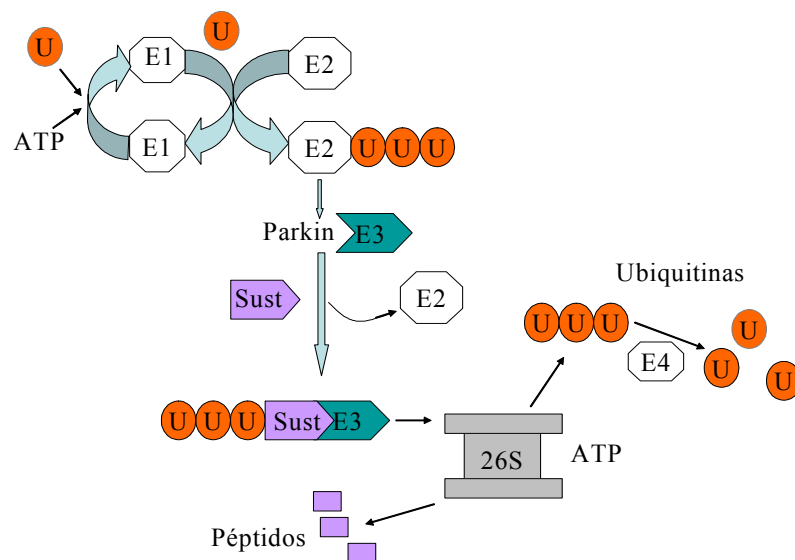


Figura 2. Sistema de ubiquitinización del proteasoma.

El sistema del proteasoma juega un papel crucial en dos procesos: 1) regular de manera exacta el nivel de proteínas de vida media corta que intervienen en procesos como la división celular, la transducción de señales y el metabolismo y 2) controlar la calidad de las proteínas sintetizadas ya que está descrito que más del 30 % de las proteínas sintetizadas tienen que ser degradadas rápidamente al no estar bien formadas (Schapira et al., 1990; Schubert et al., 2000). Además, hay factores de estrés externos que pueden producir una disfunción de proteínas que estaban bien sintetizadas.

En el caso de la parkina, las mutaciones asociadas a la enfermedad de Parkinson autosómica recesiva suelen impedir la interacción de la parkina con las enzimas E2, reduciendo o suprimiendo por completo su actividad ubiquitina- ligasa.

Aunque diferentes estudios sugieren la posibilidad de que las mutaciones en el gen *park-2*, que conllevan la supresión de la función de la parkina, producen una acumulación de los sustratos de la parkina, lo que origina la muerte selectiva de las neuronas dopaminérgicas en la enfermedad de Parkinson y es una teoría bastante aceptada, trabajos más recientes sugieren que la parkina tiene importantes funciones independientes de su actividad ubiquitina-ligasa. Existen estudios que indican la existencia de una interacción entre la parkina y la tubulina que forma parte de los microtúbulos (Ren et al., 2003) y que, de esta forma, estabiliza los microtúbulos frente a agentes que promueven la despolimerización de los mismos (Yang et al., 2005). Además, la proteína parkina presenta dos dominios RING-finger en el extremo C-terminal que se cree que pueden jugar un papel importante en la regulación de la expresión génica (Morett and Bork, 1999).

Por otro lado, hay que tener en cuenta que una de las causas más probables de muerte selectiva de las neuronas DAérgicas en la EP es la dopamina (Jenner and Olanow, 1996). La oxidación de la DA por medio de la enzima monoamino oxidasa (MAO) produce grandes cantidades de especies reactivas de oxígeno (ROS) que son altamente tóxicas para las células. Estudios realizados “in vivo” o en líneas celulares (Mena et al., 1992; Mena et al., 1993; Hastings et al., 1996; Mena et al., 1996; Luo et al., 1998) han demostrado que la DA induce la muerte celular por medio de la generación de ROS. Si tenemos en cuenta nuevos trabajos publicados, la parkina tendría una función protectora frente a la formación de ROS ya que puede suprimir la expresión de las enzimas monoamino oxidasas a nivel de ARN (Itier et al., 2003; Casarejos et al., 2005; Jiang et al., 2006). Por medio de esta función, la parkina podría limitar la expresión de las MAO, reduciéndose las especies reactivas de oxígeno que se generan durante la oxidación de la dopamina por medio de las monoamino oxidasas y protegiendo por tanto a las neuronas dopaminérgicas de la autooxidación de la dopamina.

2.2.2 Sustratos de la parkina.

Teniendo en cuenta que la parkina tiene función E3 ligasa marcando otras proteínas para que sean degradadas por el proteasoma y que la pérdida de la proteína o de su función por causa de diferentes mutaciones produce la AR-JP, se propone un modelo de patogénesis para la enfermedad de Parkinson (en ausencia de la proteína parkina) basada en la acumulación de proteínas que deberían ser degradadas, lo que induce muerte celular. Por eso, la identificación de posibles sustratos centró la atención de numerosos laboratorios que trabajan con el gen *park-2*.

Sustratos más importantes de parkina:

1) CDCrel-1 (proteína relacionada con el control de la división celular- 1): fue el primer sustrato que se identificó (Zhang et al., 2000). Pertenece a una familia de GTPasas denominadas septinas y se expresa predominantemente en el sistema nervioso, donde se asocia con las vesículas sinápticas (Beites et al., 1999). Estudios recientes han determinado que en cerebros de pacientes con AR-JP se encuentran acúmulos de CDCrel-1 (Choi et al., 2003a).

2) Sinfilina-1: se identificó originalmente como un sustrato de α -sinucleína envuelto en la formación de cuerpos de inclusión en cultivos celulares (Engelender et al., 1999). Se desconoce su función fisiológica pero se sabe que es un componente de los cuerpos de Lewy en la enfermedad de Parkinson y las sinucleinopatías relacionadas (Wakabayashi et al., 2000; Wakabayashi et al., 2002). La parkina interacciona y ubiquitina a la sinfilina-1.

3) α -sinucleína: el hecho de que la α -sinucleína sea el componente mayoritario de los cuerpos de Lewy y de que estos estén ausentes en la AR-JP hizo suponer que la actividad de la parkina era esencial para la formación de los cuerpos de Lewy. Por esto, se estudió la α -sinucleína como un posible sustrato de la parkina. Aunque la forma mayoritaria de la α -sinucleína no interacciona con la parkina (Chung et al., 2001), Shimura y su equipo identificaron una forma O-glicosilada de la α -sinucleína que interacciona y es ubiquitinizada por la parkina (Shimura et al., 2001). Los individuos con mutaciones para la parkina no degradan esa forma glicosilada de α -sinucleína, de modo que se encuentra acumulada en los cerebros de pacientes con AR-JP.

4) Receptor del tipo de la endotelina asociada a la parkina (Pael-R): es una proteína G transmembrana con homología con el receptor de endotelina tipo B (Imai et al., 2001). En el cerebro se expresa en oligodendrocitos principalmente pero también en algunas subpoblaciones de neuronas. Cuando se sobreexpresa en cultivos celulares, Pael-R tiende a desenrollarse y se vuelve insoluble induciendo, en ocasiones, muerte celular. La parkina ubiquitina la forma insoluble de Pael-R promoviendo su degradación y deteniendo la muerte inducida por Pael-R. Dos estudios sugieren un papel importante de

Pael-R en la patogénesis de la AR-JP: los acúmulos de la forma insoluble de Pael-R que se observan en los cerebros de pacientes con AR-JP (Imai et al., 2001) y que la expresión de Pael-R en neuronas de *Drosophila* causa muerte selectiva de las neuronas dopaminérgicas dependiendo de la edad (Yang et al., 2003).

5) Otros sustratos: ya hemos descrito anteriormente como la parkina se une a la tubulina y estabiliza los microtúbulos (Ren et al., 2003). La parkina también regula los niveles de expresión de la sinaptotagmina XI (Huynh et al., 2003). La sobre-expresión de p38, un componente del complejo aminoacil-ARNt sintetasa de mamíferos, está presente en los cuerpos de Lewy (Corti et al., 2003). También se ha descrito como sustrato de la parkina la proteína SEPT5_v2/CDCrel-2, otro miembro de la familia de las septinas y homólogo a CDCrel-1 (Choi et al., 2003a). Por último, la ciclina E, proteína que regula la transición de fase G1 a S en la mitosis, también interacciona de forma específica con la parkina (Staropoli et al., 2003).

3. MODELO DE RATONES MUTANTES PARA EL GEN *PARK-2*.

Para conocer los mecanismos por los cuales las mutaciones en el gen *park-2* conducen al desarrollo de la enfermedad de Parkinson usamos un modelo animal en el que el gen de la parkina ha sido inactivado (Itier et al., 2003).

La obtención de los ratones mutantes para el gen de la parkina se realizó mediante la delección de un fragmento de ADN de 12 Kb que corresponde al exón 3 del gen *park-2* del ratón. Para ello, se creó un vector portador de la delección del exón 3 y parte del intrón 4 con una resistencia a neomicina (Fig. 3 A). Mediante recombinación genética se produce la delección que se confirmó por Southern blot (Fig. 3 B). Usando técnicas de Northern blot, se confirmó que el ARN mensajero correspondiente a la parkina desaparece en el ratón mutante de manera que usando los exones 2, 3 y 4 del gen *park-2* para hacer una prueba, vemos que desaparece la banda correspondiente al exón 3 (Fig. 3 C). La consecuencia de esta delección es que se produce un cambio de la pauta abierta de lectura a nivel del codón 57 y aparece una señal de parada en la posición 105.

Los ratones portadores de la mutación (PK-KO) son viables y fértiles y no tienen mayor mortalidad que los ratones salvajes (WT) aunque hemos visto recientemente que tienen una esperanza de vida menor. Mediante técnicas de Western blot, usando un anticuerpo anti- parkina, vemos que la banda correspondiente a la proteína parkina ha desaparecido (Fig. 3 D).

Los ratones PK-KO no presentan comportamientos anormales. Además, los ratones no presentan diferencias en cuanto a la morfología del cerebro, peso o tamaño cerebral y no presentan señales de degeneración muscular (Itier et al., 2003).

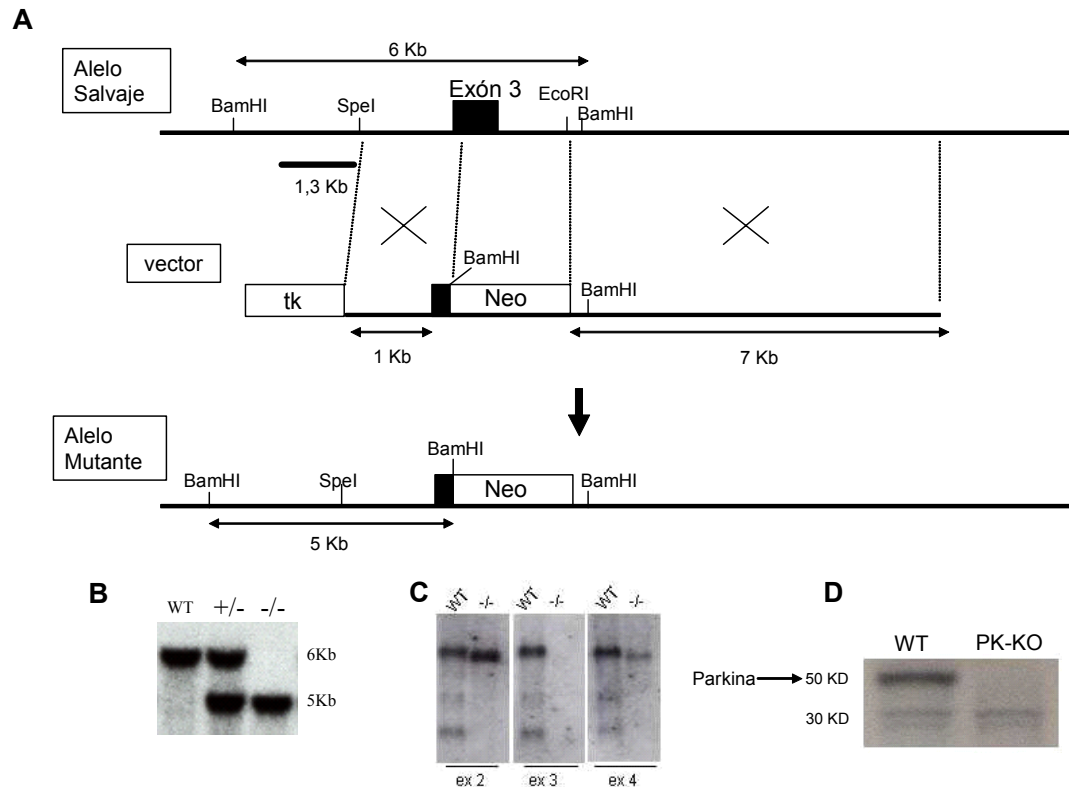


Figura 3. Inactivación del gen *park-2*. A) Estrategia para inactivar el gen que codifica para la proteína parkina en el ratón. B) Southern blot de ADN genómico procedente de ratones salvajes (WT) y mutantes para el gen de la parkina (PK-KO). C) Northern blot: ARN total del cerebro de ratones WT y PK-KO. D) Demostración de la ausencia de la proteína parkina por Western blot.

Al hacer estudios proteicos vemos que no existen diferencias significativas entre los ratones WT y los PK-KO en cuanto a los niveles de tirosina hidroxilasa en la sustancia nigra. La confirmación de esta observación se obtuvo mediante un estudio de la región del estriado usando técnicas de Western blot (Fig. 4 A). Tampoco se observaron diferencias al estudiar otras proteínas como la α -sinucleína, ubiquitina, sinapsina, sinaptofisina, proteína asociada a microtúbulos y NeuN. Por el contrario, vemos que hay una reducción significativa en los niveles del transportador de la dopamina y en el transportador vesicular de monoaminas 2 (VMAT-2) (Fig. 4 B).

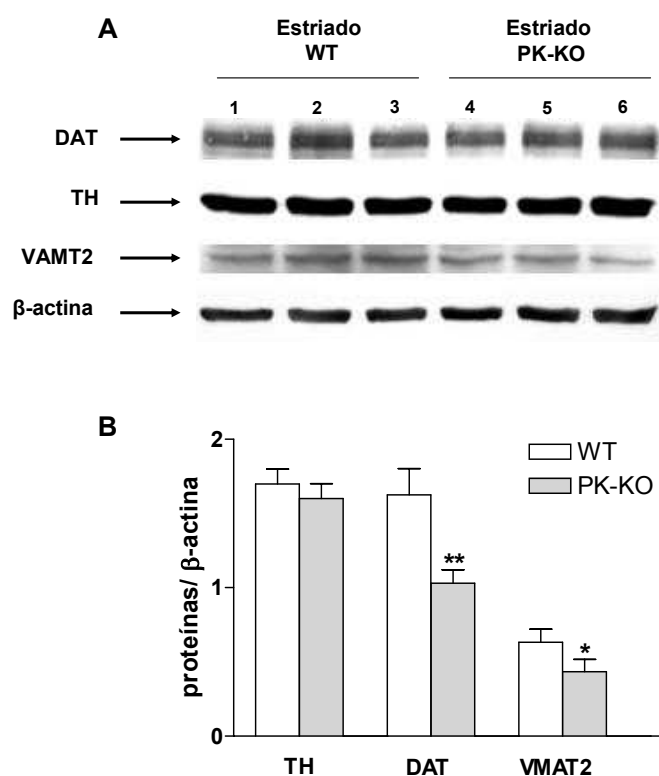


Figura 4. Marcadores proteicos de neuronas dopaminérgicas en ratones WT y PK-KO. A) Western blot representativos de las proteínas tirosina hidroxilasa (TH), transportador de dopamina (DAT) y transportador vesicular de monoaminas (VMAT2) en cerebros procedentes de ratones adultos WT (1-3) y PK-KO (4-6). La β-actina se usó como control de carga. B) Histogramas correspondientes. Los valores se expresan como la media ± SEM (n = 6 animales por grupo experimental). El análisis estadístico utilizado fue un ANOVA seguido de un t- test de Student. * p<0.05; ** p<0.01 PK-KO vs sus respectivos ratones WT.

Al estudiar el metabolismo de las monoaminas vemos que los niveles endógenos de dopamina están incrementados en el sistema límbico de los ratones PK-KO, al igual que los cocientes DOPAC/DA y DOPAC/3-MT. Los mayores niveles de dopamina y el incremento en el metabolismo de la dopamina: 1) a DOPAC por la vía de la MAO, enzima que se considera mayoritariamente intraneuronal y 2) a 3-metoxi-tiramina (3-MT) por la vía de la catecol-orto-metiltransferasa (COMT), enzima considerada mayoritariamente extraneuronal, sugieren que la disfunción o la ausencia de la proteína parkina interfiere con la liberación de la dopamina e incrementa el metabolismo intracelular de la dopamina vía MAO (Itier et al., 2003).

El incremento del metabolismo de la dopamina por la MAO en ratones PK-KO adultos está compensado con un incremento de los niveles del GSH en el estriado (Fig. 5 A). Además, encontramos que este incremento de los niveles de GSH en áreas ricas en dopamina aparece ya en fetos (E13) de los ratones mutantes para el gen de la parkina (Fig. 5 B).

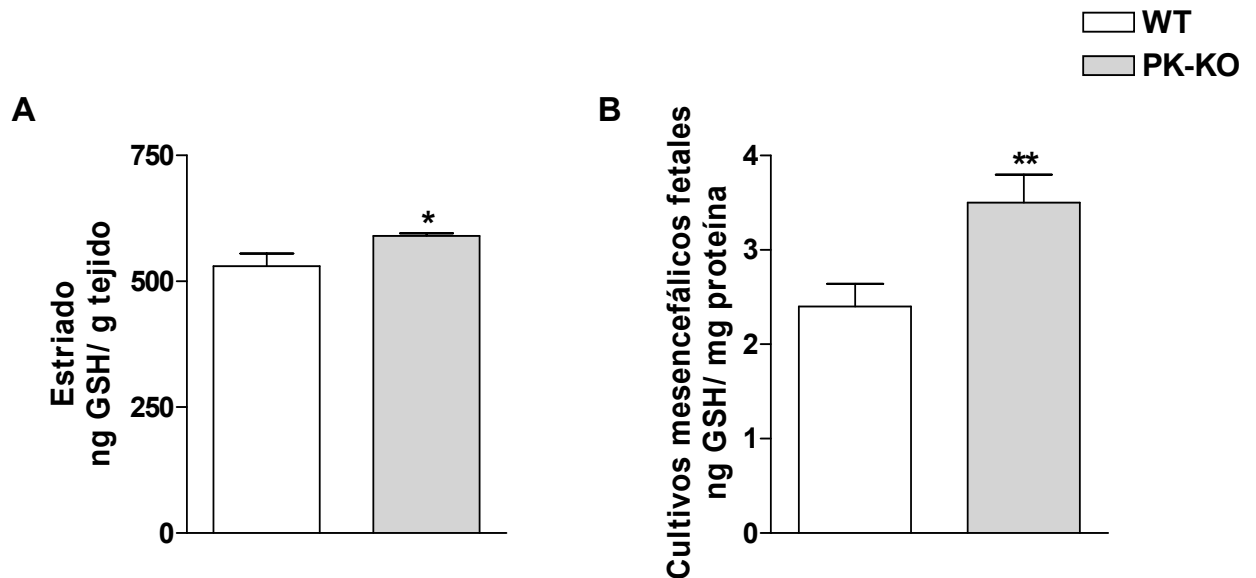


Figura 5. Los ratones PK-KO tienen un incremento significativo en los niveles de GSH respecto a los ratones WT. A) Niveles de GSH en el estriado de ratones adultos WT y PK-KO. Los resultados se expresan en ng de GSH por g de tejido. B) Niveles de GSH en cultivos fetales (E13) mesencefálicos primarios procedentes de ratones WT y PK-KO. Los resultados se expresan en ng de GSH por mg de proteína. Los valores se expresan como la media \pm SEM ($n = 6$ animales por grupo experimental). El análisis estadístico utilizado fue un ANOVA seguido de un test de Newman-Keuls. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ PK-KO vs sus respectivos ratones WT.

Tanto la liberación de ^3H -DA basal como la liberación de ^3H -DA dependiente de K^+ (que es un índice de liberación vesicular de dopamina) es similar en los cultivos neuronales procedentes de ratones salvajes y mutantes para el gen de la parkina (Fig. 6 A). La liberación de ^3H -DA inducida por anfetamina (indica liberación de dopamina sintetizada de “novo”) está significativamente disminuida en los cultivos neuronales procedentes de los ratones PK-KO (Fig. 6 A). Además, la captación de ^3H -DA es también menor en los cultivos mesencefálicos primarios procedentes de los ratones PK-KO (Fig. 6 B). Estos resultados concuerdan con la reducción que hemos descrito anteriormente de los niveles del transportador de dopamina en los ratones transgénicos, sugiriendo que existe un descenso tanto de la expresión como de la función del transportador de dopamina en los ratones mutantes para el gen de la parkina y una alteración en la liberación de DA dependiente de anfetaminas.

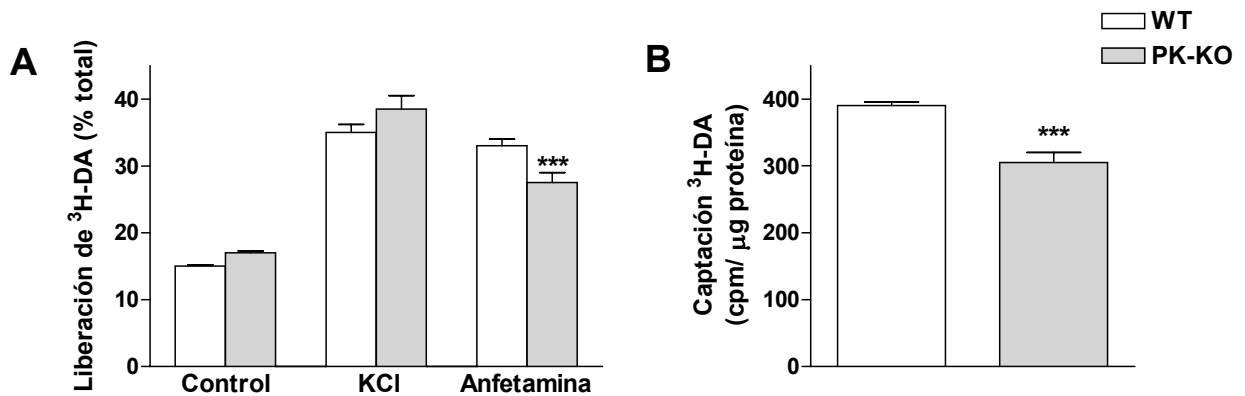


Figura 6. Los ratones PK-KO tienen una liberación de ^3H -DA basal e inducida por KCl normal, pero tienen una menor liberación de ^3H -DA inducida por anfetamina. A) Liberación de ^3H -DA en cultivos mesencefálicos neuronales de ratones WT y PK-KO mantenidos 7 DIV. B) Captación de alta afinidad para ^3H -DA en cultivos mesencefálicos primarios de ratones WT y PK-KO mantenidos 7 DIV. Los valores se expresan como la media \pm SEM (n = 6). El análisis estadístico utilizado fue un ANOVA seguido de un test de Newman-Keuls. *** $p < 0.001$ PK-KO vs sus respectivos ratones WT.

Con este trabajo vimos que los ratones mutantes para el gen de la parkina tienen anomalías en la liberación y en el transporte de la DA. El incremento del metabolismo de la dopamina por la vía de la MAO hace que las células estén sometidas a un mayor estrés oxidativo. Usando este modelo de ratones nulos para el gen *park-2*, quisimos estudiar los efectos de diferentes neurotóxicos, que inducen estrés oxidativo, sobre la supervivencia de las neuronas DAérgicas tanto en modelos “in vitro” como “in vivo”.

II. OBJETIVOS

OBJETIVOS

1. Caracterización de los cultivos primarios mesencefálicos fetales (E13) enriquecidos en neuronas procedentes de ratones salvajes (WT) y nulos para el gen de la parkina (PK-KO).
2. Identificar los efectos diferenciales sobre el fenotipo celular y la vulnerabilidad de las neuronas dopaminérgicas en ratones WT y PK-KO tras inducir estrés oxidativo por diferentes vías farmacológicas (L-DOPA; DEA/NO y Rotenona). En concreto, estudiaremos:
 - 2.1 Efecto sobre la supervivencia y la apoptosis de neuronas. Diferenciación, funcionalidad y supervivencia de las neuronas dopaminérgicas.
 - 2.2 Papel de las células gliales.
 - 2.3 Homeostasis del glutathion (GSH).
3. Investigar las rutas de señalización intracelular que pueden estar implicadas en los distintos procesos de supervivencia y muerte neuronal en los ratones WT y PK-KO.
4. Búsqueda de estrategias neuroprotectoras frente a la toxicidad inducida por los diferentes agentes neurotóxicos en ratones WT y PK-KO.
5. Estudio de un modelo de Parkinson “in vivo” en ratones WT y PK-KO tratados con cinarizina, un antagonista de calcio, que induce Parkinson en humanos.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

1. MATERIALES Y REACTIVOS

1.1. Cultivos celulares

Albúmina de suero bovina (BSA)	SIGMA
D- Glucosa 45 %	SIGMA
Dimetil sulfóxido (DMSO)	SIGMA
DNAsa	SIGMA
Embriones (E13) de ratones C57BL6/129SV	Aventis Pharma S.A.
Frascos de cultivo celular	NUNCLON
Glutamina	GIBCO
Insulina	SIGMA
Laminina	ROCHE
Medio de cultivo Eagle Modificado por Dulbecco (DMEM) con 4.5 g/l de glucosa	BIOWHITAKER
Medio de cultivo Neurobasal TM	GIBCO
Medio de cultivo F-12 (Ham) con L- Glutamina	GIBCO
Medio esencial mínimo con sales de Earle y L-Glutamina	GIBCO
Medio Hank's Balanced SALT Solution (HBBS)	INVITROGEN
Papaina	SIGMA
Penicilina estreptomicina	GIBCO
Piruvato	GIBCO
Piruvato sódico	INVITROGEN
Placas multipocillos	COSTAR
Poli D- Lisina	SIGMA
Progesterona	SIGMA

Putrescina	SIGMA
Selenito sódico	SIGMA
Suero fetal bovino	GIBCO
Suplemento B-27	GIBCO
Tinte azul de Tripán (0,4 %)	SIGMA
Transferrina humana	ROCHE
Tripsina-EDTA solución (10x)	SIGMA

1.2. Reactivos de técnicas metodológicas

Ácido aminooxiacético	SIGMA
Ácido ascórbico	SIGMA
Ácido nitrobenzóico	SIGMA
Glutation oxidado (GSSG)	SIGMA
Glutation reducido (GSH)	SIGMA
Glutation reductasa	ROCHE
3- Hidroxitiramina (dopamina, DA)	SIGMA
Ácido 3,4- Dihidroxi-fenil-acético (DOPAC)	SIGMA
5- Hidroxitriptamina (Serotonina, 5-HT)	SIGMA
[³ H]-DA (70 Ci/mmol)	AMERSHAM
[³ H]-GABA (90 Ci/mmol)	AMERSHAM
Lactato deshidrogenasa	ROCHE

Mazindol (inhibidor de la captación de noradrenalina y dopamina)	SANDOZ
NADPH	ROCHE
Pargilina (inhibidor de MAO A y B)	SIGMA
Sulfanilamida	SIGMA
2-vinilpiridina	SIGMA

1.3. Reactivos de tratamientos farmacológicos en cultivos celulares

Apocinina (inhibidor de NADPH oxidasa)	CALBIOCHEM
Boc-D-FMK (inhibidor de la Caspasa III)	CALBIOCHEM
BSO (inhibidor de la síntesis de glutatión)	SIGMA
DEA-NO (donador de óxido nítrico)	SIGMA
Indometacina (inhibidor de ciclooxigenasa)	CALBIOCHEM
L-DOPA (L-3,4-Dihidroxifenilalanina)	SIGMA
L-NAME (inhibidor de NOS)	SIGMA
LY-294002 (inhibidor de PI3K)	ALEXIS
Minociclina (antibiótico que inhibe la activación de la microglía)	SIGMA
7-Nitroindazol (inhibidor de NOS)	SIGMA
PD 98059 (inhibidor de p-ERK1/2)	ALEXIS
Rotenona (inhibidor del complejo I de la cadena respiratoria mitocondrial)	SIGMA
SB 203580 (inhibidor de P-38- MAPK)	ALEXIS

1.4. Reactivos para inmunocitoquímica

Ácido acético glacial	PANREAC
Etanol absoluto	MERCK
Glutaraldehído	MERCK
Hoescht 33342 (bisbenzimidaz)	SIGMA
Kit ABC	DAKO
Kit Streptavidina-ABC	DAKO
Kit TUNEL	PROMEGA
Paraformaldehído	MERCK
Tritón x-100	SIGMA

1.5. Reactivos para Western Blot

Acrilamida/ Bisacrilamida	BIORAD
Albumina	SIGMA
Azul de Bromofenol	SIGMA
Glicerol	SIGMA
Glicina	SIGMA
Leche en polvo desnatada	Central Lechera Asturiana
Metanol	MERCK
Persulfato amónico (PSA)	SIGMA
SDS (sal de dodecilsulfato sódico)	MERCK
TEMED	SIGMA
Trizma Base	SIGMA
Tween- 20	BIORAD

1.6. Anticuerpos

Anticuerpo secundario anti- ratón	AMERSHAM
Anticuerpo secundario anti- conejo	AMERSHAM
Anticuerpo anti-CDCrel-1, policlonal de conejo	Aventis Pharma S.A.
Anticuerpo anti- parkin, policlonal de conejo	CHEMICON
Anticuerpo anti-Tirosina Hidroxilasa, monoclonal de ratón	CHEMICON
Anticuerpo anti- GFAP (Proteína ácida fibrilar de glía), monoclonal de ratón	CHEMICON
Anticuerpo anti-NeuN, monoclonal de ratón	CHEMICON
Anticuerpo anti- β -tubulina, policlonal de conejo	COVANCE
Anticuerpo anti-GFAP (Proteína ácida fibrilar de glía), policlonal de conejo	DAKO
Anticuerpo anti-inmunoglobulina Ig(G) hecho en oveja marcado con isotiocianato de fluoresceína (FITC)	JACKSON
Anticuerpo anti-Ig(G) de conejo, hecho en cabra conjugado con Lisamina-Rodamina	JACKSON
Anticuerpo IgG Alexa Fluor de ratón	MOLECULAR PROBES
Anticuerpo anti-NSE, policlonal de rata	POLYSCIENCES
Anticuerpo anti-Bclx _{L/S} , policlonal de conejo	SANTACRUZ
Anticuerpo anti-Bax, policlonal de conejo	SANTACRUZ
Anticuerpo anti-OX6, monoclonal de ratón	SEROTEC
Anticuerpo anti- MAP2 (Proteína asociada a microtúbulos 2a+2b) monoclonal de ratón	SIGMA
Anticuerpo anti- β -actina, monoclonal de ratón	SIGMA
Isolectina B4 unida a peroxidasa	SIGMA
Anticuerpo secundario anti-ratón conjugado con fosfatasa alcalina	SIGMA
A ₂ B ₅ (marcador de progenitores gliales)	Sobrenadante de hibridomas (Raff et al 1979; Raff et al 1983)
O1 (marcador de oligos)	Sobrenadante de hibridomas (Raff et al 1979; Raff et al 1983)

Anticuerpo anti- Nestina	Sobrenadante de hibridomas (Raff et al 1979; Raff et al 1983)
--------------------------	---

2. MÉTODOS

2.1 Cruce y genotipado de los ratones salvajes y mutantes para el gen de la parkina.

Los ratones 129SV/C57BL6 salvajes (WT) y nulos para la proteína parkina (PK-KO) se obtuvieron de colonias homocigotas generadas por cruces de ratones heterocigotos para el gen *park-2*, para conseguir un fondo genético similar en los dos grupos de ratones.

El genotipo se confirmó por técnicas de PCR. Para extraer el ADN, cortamos un trozo de cola de un centímetro aproximadamente, se trocea y se añaden 700 µl de tampón de digestión (50 mM Tris pH 8.3, 100 mM NaCl, 5 mM EDTA, 0.8 % SDS, 0.5 mg/ml proteinasa K) y lo incubamos a 55 °C durante toda la noche en agitación. Se centrifuga 5 minutos a 12.000 rpm y se recoge el sobrenadante. Para extraer el ADN se añade fenol: cloroformo: alcohol isoamílico (FCI) (25:24:1), en una relación V:V (1:1). Se centrifuga a 12.000 rpm durante 15 min, se recoge el sobrenadante y se repite el proceso. Posteriormente, precipitamos el ADN añadiendo etanol absoluto en una relación V:V (1:1) al que añadimos acetato sódico 3 M, pH 5.2. Agitamos y dejamos 10 minutos a -20 °C. Centrifugamos 10 minutos a 12.000 rpm y desechamos el sobrenadante. Lavamos el pellet con etanol 70 % y dejamos el ADN 5 minutos a 4 °C. Centrifugamos 10 minutos a 12.000 rpm, decantamos el sobrenadante y resuspendemos el ADN en agua estéril incubando entre 40 y 60 minutos en agitación suave a 37 °C.

Con una PCR clásica usando los primers adecuados confirmamos el genotipo de los ratones. Brevemente, hacemos una mezcla de reacción en la que tenemos todos los componentes necesarios para que tenga lugar la reacción enzimática de amplificación del ADN: buffer para la reacción, cloruro de magnesio (25 mM), dNTPs (10 mM), primers, Taq ADN polimerasa y el ADN que queremos amplificar. Los primers que utilizamos para la PCR son los siguientes:

PK1F: 5' TGCTCTGGGGTTCGTC3'

PK2F: 5' TTGTTTTGCCAAGTTCTAAT 3'

PKR: 5' TCCACTGGCAGAGTAAATGT 3'

Las condiciones del termociclador para realizar la PCR son las siguientes: 3 minutos a 94 °C, 35 ciclos de 1 minuto a 94 °C, 1 minuto a 53 °C y 1 minuto a 72 °C; finalmente, 5 minutos a 72 °C y mantenemos el producto de la amplificación a 4 °C.

Para obtener los embriones E13 necesarios para la realización de los experimentos "in vitro" mantenemos dos colonias de ratones WT y PK-KO separadas. Realizamos el número de cruces necesarios para tener siempre suficientes hembras preñadas, de modo que tenemos un conjunto de machos reproductores (n = 6) que renovamos cuando están un

período de 1 semana sin cubrir a las hembras y un conjunto de hembras en una relación 3:1 con respecto a los machos.

2.2. Experimentos “*in vitro*”

2.2.1. Cultivos primarios neuronales mesencefálicos

2.2.1a. Cultivos primarios neuronales de mesencéfalo de embrión (E13) de ratones salvajes y mutantes para el gen de la parkina.

Trabajamos con cultivos mesencefálicos enriquecidos en neuronas obtenidos de ratones 129SV/C57BL6 tanto WT como PK-KO. Usamos embriones de 13 días de gestación que corresponde a un estado de desarrollo embrionario óptimo para la obtención de cultivos celulares de neuronas dopaminérgicas. Las neuronas de la pars compacta se desarrollan en el período E12- E15 (Lauder et al., 1982; Gates et al., 2006) de los que extraemos la parte ventral del mesencéfalo. Los tejidos procedentes de la disección se recogieron, con una punta P1000 cortada 1.5 mm, a una placa petri con medio L-15 y los incubamos con papaína (0.36 mg/ml) en un tampón que contiene PBS/ D-glucosa (6 mg/ml)/ BSA 1 % durante 15 minutos a 37 °C y se disocian en presencia de DNAsa-I (10 mg/ml). El tejido se trituró suavemente y una vez disgregadas las células se valoró el número de células vivas y muertas por el método de exclusión de azul tripan, en una cámara de Neubauer.

Las células se siembran en medio Neurobasal con suplemento B27 al 1% (B27/ NBL) con 15 % de suero fetal (V:V) (B27/ NBL-FCS) suplementado con glutamina (4 mM), penicilina (100 U/ml) y estreptomycin (100 µg/ml) (Brewer et al., 1993) a una densidad de 2×10^5 células/cm² en placas de 24 pocillos o 2×10^5 células/cm² en cubreobjetos previamente tratados con poli- D- lisina (4.5 µg/cm²) en un tampón borato (0.1 M pH 7.8) y laminina (3 µg/ml). Los cultivos se mantuvieron en una cámara húmeda en un incubador a 37 °C y una atmósfera con CO₂ (5 %) durante 7 días “*in vitro*” (DIV). 24 horas después del cultivo, las células se cambian a un medio libre de suero (B27/NBL).

Las células se sembraron sobre cubreobjetos (200.000 células/ cubre) de vidrio lavados y esterilizados con etanol al 80 %, para los experimentos de inmunocitoquímica, o sobre placas de multipocillos de plástico (250.000 células/ pocillo) para los experimentos de viabilidad y caracterización farmacológica, y de 12 pocillos (400.000 células/ pocillo) para los experimentos de inmunodetección de proteínas.

2.2.1b. Cultivos enriquecidos en neuronas

Los cultivos se mantuvieron en una cámara húmeda en un incubador a 37 °C y una atmósfera con CO₂ (5 %) durante 7 DIV; 24 horas después de la siembra, las células se cambian a un medio libre de suero (B27/ NBL).

Este medio, sin suero, mantiene la población de células dopaminérgicas limitando el crecimiento de células no-neuronales.

2.2.1c. Cultivos enriquecidos en astrogía

Las células se obtuvieron a partir del mesencéfalo de embriones E13 y mantenidas en medio Dulbecco con suero fetal bovino al 15 % y suplementado con glutamina (4 mM), penicilina (100 U/ml) y estreptomycin (100 µg/ml), y piruvato (1 mM) durante 15 días a tres meses (Mena et al., 2002). Semanalmente se les cambió el medio sustituyéndolo por medio fresco. El marcaje positivo con un anticuerpo específico frente a la proteína ácida gliofibrilar (GFAP⁺) que marca positivamente las células astrogiales, demostró que pasados 15- 20 días en cultivo, el 80- 90 % del total de células eran astrocitos.

2.2.1d. Cultivos enriquecidos de microglía

Los cultivos enriquecidos en microglía se prepararon a partir de células procedentes de los cultivos gliales descritos anteriormente. En los cultivos gliales procedentes de ratones PK-KO, al cabo de 5- 6 pases, prolifera la microglía. La microglía se separó de los astrocitos mediante la agitación de los frascos durante 5 horas a 150 rpm. Mediante un marcaje inmunocitoquímico con anticuerpos para GFAP e isolectina B4 comprobamos que los cultivos enriquecidos en microglía tienen una pureza superior al 95 %.

2.2.2. Caracterización inmunocitoquímica

2.2.2a. Caracterización de los distintos fenotipos celulares en cultivos WT y PK-KO.

La caracterización fenotípica de los cultivos se realizó mediante técnicas inmunocitoquímicas. Las neuronas dopaminérgicas de los cultivos mesencefálicos primarios se caracterizaron por la inmunotinción con un anticuerpo que reconoce la tirosina hidroxilasa (TH), enzima limitante en la biosíntesis de catecolaminas y marcador de neuronas catecolaminérgicas, el anticuerpo monoclonal de ratón anti-TH⁺, se utilizó a una dilución 1:100.

Los astrocitos se caracterizaron con el anticuerpo frente a la proteína ácida fibrilar de la glía, anti-GFAP policlonal a una dilución 1:500. Para la caracterización de la población neuronal del cultivo se utilizó el anticuerpo que reconoce la proteína asociada a

microtúbulos anti-MAP-2, monoclonal a una dilución 1:250, y también el anticuerpo anti-NeuN a una dilución 1:10; la microglía presente en el cultivo con isoelectina acoplada a peroxidasa a una dilución 1:10; los oligodendrocitos mediante el anticuerpo anti-O₁ a una dilución 1:10; los progenitores oligodendrogiales con el anticuerpo anti-A₂B₅ diluido 1:10, cedido por Raff (Raff et al., 1983), obtenido de un hibridoma; por último, los progenitores neuronales mediante el anticuerpo anti-nestina 1:10, obtenido de un hibridoma.

2.2.2b. Métodos inmunocitoquímicos

Las células se sembraron sobre cubreobjetos previamente cubiertos con poli-D-lisina y laminina y se fijaron durante 10 minutos en paraformaldehído (PFA) al 4 % en tampón fosfato salino (PBS). Después se realizaron tres lavados con PBS, y se procedió a su postfijación y permeabilización con una solución de etanol: acético glacial (19:1) durante 10 minutos a -20 °C seguidos de otros tres lavados con PBS; posteriormente se procedió al bloqueo de la tinción inespecífica con PBS más suero fetal bovino al 10 % durante 20 minutos a temperatura ambiente.

Pasado el tiempo del bloqueo, se incubó con el anticuerpo primario específico de la proteína a estudiar, en una mezcla de PBS y suero durante toda la noche a 4 °C. Se lavaron los cubres con PBS tres veces y después se bloquearon de nuevo durante 10 minutos a temperatura ambiente. Tras retirar la solución de bloqueo de los cubres se incubaron con los anticuerpos secundarios correspondientes, en el caso de que la tinción sea inmunofluorescente, el anti- IgG marcado con FITC (1:100) o rodamina (1:100) en PBS más suero fetal bovino durante 45 minutos en oscuridad y a temperatura ambiente. La mezcla de anticuerpos secundarios se centrifugó previamente a 10.000 rpm durante 2 minutos en oscuridad y a 4 °C para evitar la presencia de cristales de fluorocromo en las muestras. Se lavaron los cubres con PBS y por último los cubres se montaron en portaobjetos sobre una gota de solución antidecolorante, non- fade (50 mg de p-fenilendiamina disuelta en PBS 0.01 M-glicerina 1:9 ajustando a pH 8 con tampón carbonato-bicarbonato 0.5 M, pH 9.2) que contenía bis- benzimida (Hoescht 33342, que tiñe todos los núcleos al unirse al ADN) a una concentración de 3×10^{-5} M. Para valorar la fluorescencia inespecífica, se incubaron algunos cubres con el anticuerpo secundario sin haber incubado con el anticuerpo primario.

Si el anticuerpo está conjugado directamente con la enzima se revela directamente, después se lava tres veces con TBS y se revelan los cubres con diaminobenzidina (5 % DAB + 0.05 % H₂O₂) si el anticuerpo está conjugado con peroxidasa, y con Fast-red si el anticuerpo está conjugado con fosfatasa alcalina.

2.2.2c. Valoración del área ocupada por astrocitos (GFAP⁺) y por neuronas (MAP2⁺)

Con el fin de determinar los cambios producidos con los diferentes tratamientos farmacológicos en los cultivos celulares, tanto en la población astrocitaria como en la población neuronal, se utilizaron los anticuerpos anti-GFAP⁺ y anti-MAP-2⁺. Mediante un microscopio invertido de fluorescencia acoplado a una cámara SONY 950 C, se captaron 20 campos al azar de cada cubre lo que corresponde a 1/7 del área total de cubreobjeto. Las imágenes de las células fueron procesadas mediante un programa de análisis de imagen (Image-Proplus).

De la imagen captada con el microscopio de fluorescencia, mediante el programa de análisis de imagen valoramos el área y la intensidad de la tinción de la población astrocitaria y de la población neuronal. El parámetro IOD se define como densidad óptica integrada o también intensidad óptica integrada, que es lo mismo que el área x la densidad óptica (o intensidad óptica).

2.2.2d. Cuantificación de células para cada anticuerpo

Para la cuantificación de los distintos fenotipos celulares se contaron 20 campos (al azar) visuales de cada cubreobjeto mediante un objetivo de magnificación 40x y 10 campos para la cuantificación de los núcleos y se corrigieron por el área total del cubreobjeto. Valoramos 6 cubres, como mínimo, por cada grupo experimental.

2.2.3. Ensayos de viabilidad celular

2.1.3a. Actividad mitocondrial

La actividad mitocondrial se determinó mediante el ensayo de MTT que mide la capacidad de la mitocondria para reducir 3-(4,5-dimethyldiazol-2-yl)-2,5 diphenyl tetrazolium bromide.

Al final del tratamiento experimental, 300 µl del medio de cultivo de cada pocillo de la placa se retiraron y a los 200 µl restantes se les añadieron 20 µl de la solución de MTT durante 1 hora a 37 °C. Transcurrida la hora de incubación se añadieron 200 µl de la solución de lisis (10 % SDS en HCl 0.01 M) y se mantuvo la placa a 37 °C durante 24 horas. 100 µl de medio se traspasaron a una placa de 96 pocillos y se midió la absorbancia a 540 nm en un lector de placas (SpectraFluor; Tecan, Mannedorf, Switzerland).

2.2.4. Ensayos de muerte celular programada o apoptosis

2.1.4a. Condensación y fragmentación de la cromatina

Las células que teníamos creciendo en cubreobjetos, se fijaron con paraformaldehído (PFA 4 %), y los núcleos se tiñeron con bis- benzimida (Hoescht 33342) añadiendo non-fade a la solución (Pardo et al., 1997). Se realizó un conteo, en el microscopio de fluorescencia, de 10 campos randomizados del área total del cubre. Se consideró célula apoptótica aquella cuya cromatina apareciera condensada o fragmentada al microscopio.

2.2.4b. Técnica de TUNEL

Incorpora la fluoresceína-12-dUTP a los extremos 3'-OH del ADN fragmentado de las células apoptóticas, usando la enzima TdT deoxynucleotidyl transferasa (Whiteside and Munglani, 1998). Para este ensayo las células se fijaron con PFA 4 % y se permeabilizaron con 0.2 % Tritón. Las células apoptóticas se detectaron mediante microscopía de fluorescencia, apareciendo las células apoptóticas de color verde. El número de células positivas se contaron en 20 campos del área total del cubreobjeto. Las células incubadas con el tampón pero sin la enzima TdT fueron los controles negativos.

2.2.5. Ensayos de muerte celular por necrosis

2.2.5a. Actividad lactato deshidrogenasa (LDH)

Para determinar la muerte celular por necrosis se midió la actividad lactato deshidrogenasa en el medio de cultivo utilizando un kit de detección citotóxica (Decker and Lohmann-Matthes, 1988).

2.2.5b. Ensayo de exclusión por azul-tripán

Con el fin de determinar muerte celular por necrosis también se utilizó el ensayo de exclusión de azul-tripán, que permite la entrada del colorante a las células cuya membrana celular está rota; expresando los datos como el porcentaje de células viables con respecto al total de células del cultivo.

2.2.6. Análisis de nitritos

La producción de óxido nítrico se determinó mediante la medida de los nitritos, producto estable de su oxidación (Wu and Thiemermann, 1996). Al término del tratamiento experimental se recogieron 400 µl del medio de cultivo y se mezclaron con 800 µl del reactivo de Griess (1.5 % sulfanilamida en 1 N HCl + 0.15 % N-(1-naftil) etilenediamina dihidroclorato), se mantuvo la mezcla durante 10 minutos a temperatura ambiente y en

oscuridad y se determinó la absorbancia a 540 nm en un lector de placas (SpectraFluor; Tecan, Mannedorf, Switzerland)

2.2.7. Análisis de la concentración de glutathion

Los niveles de glutathion se midieron siguiendo el protocolo de Tietze (1969). Se trata de un método enzimático basado en la oxidación de la forma reducida del glutathion por el compuesto 5,5'-ditiobis (2-ácido nitrobenzóico) (DTNB), el DTNB al reducirse en esta reacción, incrementa su absorbancia a 412 nm. Por la acción de la enzima glutathion reductasa (GR) se recicla el glutathion oxidado (GSSG) para dar glutathion reducido (GSH) y se repite el proceso incrementando la absorbancia a 412 nm en cada ciclo. Para el ensayo, las células se lavaron con PBS 2 veces y se lisaron con 100 μ l de ácido perclórico (PCA) 0.4 N a 4 °C durante 30 minutos. Después se centrifugaron las células y se recogieron los sobrenadantes a los cuales se les neutralizó con cuatro volúmenes de un tampón NaH_2PO_4 0.1 M, EDTA 5 mM, pH 7.5. Se recogieron 50 μ l y se añadieron DTNB (0.6 mM), NADPH (0.2 mM) y glutathion reductasa, la reacción enzimática se monitorizó en un lector de placas midiendo la absorbancia a 412 nm durante 6 minutos. Se realizó en paralelo una curva patrón de GSH con concentraciones crecientes desde 6.25 hasta 100 ng.

El GSSG se determinó en las células por el método de Griffith (1982). Después de la extracción con PCA y posterior neutralización del pH, el GSH se derivatizó con 2-vinilpiridina (2-VP) durante 1 hora, impidiendo así que reaccione con el DTNB y así se obtiene el GSSG. Los niveles de glutathion reducido se calcularon restando del glutathion total el glutathion oxidado. La concentración se expresa en ng de GSH/ μ g de proteína.

El S- nitrosoglutation (GSNO) intracelular se midió de modo indirecto. Después de tratar los cultivos los lavamos con PBS pH 7.4 en frío. Posteriormente, raspamos las células en 200 μ l PBS y las sonicamos durante treinta segundos. Separamos dos fracciones iguales de ese volumen, incubando una parte con CuSO_4 (0.1 mM) y la otra sin CuSO_4 , que es un compuesto que rompe los enlaces tiólicos, durante 20 minutos en agitación a 37 °C. Pasamos las muestras a frío y añadimos PCA (0.4 N concentración final), agitamos y centrifugamos 5 minutos a 12.000 rpm. Posteriormente, medimos los niveles de GSH intracelulares en las fracciones con y sin CuSO_4 ; la diferencia entre ellas nos dará la concentración de GSNO intracelular presente en los cultivos.

2.2.8. Captación de alta afinidad para [^3H]-dopamina

Las células que crecían en una placa de 24 pocillos se incubaron con 10^{-8} M [^3H]-DA (70 Ci/mmol), en presencia de pargilina 10^{-5} M (inhibidor de la enzima monoamino oxidasa) y de ácido ascórbico 10^{-3} M a 37 °C durante 20 minutos. La captación no específica se calculó en presencia de mazindol 10^{-5} M, inhibidor de la captación específica de dopamina (Beart

and McDonald, 1980). Trascurridos 20 minutos, la captación de alta afinidad y dependiente de temperatura se paró en hielo y se lavaron las células tres veces con PBS frío, se añadieron 200 μ l de NaOH y se contaron 80 μ l con 3 ml de líquido de centelleo OptiPhase 'HiSafe' 2 en un contador de centelleo líquido (Wallac).

2.2.9. Captación de alta afinidad de [3 H]-GABA

La captación de [3 H]-GABA se realizó en presencia de 10^{-5} M de ácido aminooxiacético, inhibidor del metabolismo de GABA, y de 10^{-3} M de ácido ascórbico. Se incubó durante 4 minutos con 10 nM de [3 H]-GABA (90 Ci/mmol). La captación no específica se calculó incubando los cultivos a 0 °C, y esa captación inespecífica resultó siempre menor de un 7 % del total (Michel and Hefti, 1990).

2.2.10. Electroforesis, transferencia e inmunodetección de proteínas

Las células se sembraron en placas de 12 pocillos a una densidad de 4×10^5 células/cm² y se mantuvieron durante 7 DIV. Después de los distintos tratamientos se retiró el medio de cultivo y se añadieron 150 μ l de tampón de lisis (Tris-HCl 20 mM, AcK 10 mM, DTT 1 mM, EDTA 1 mM, PMSF 1mM, benzamidina 1 mM, leupeptina, aprotinina y pepstatina 5 μ g/ml (inhibidores de proteasas). Las células se recogieron en hielo y con ayuda de un rascador, manteniendo las células en hielo durante 10 minutos y después se sonicaron durante 30 segundos. Las muestras se centrifugaron durante 30 minutos a 12.000 rpm y a 4 °C. Del sobrenadante se hicieron alícuotas y se congelaron a -80 °C. Después se determinó por el método de BCA la concentración de proteínas.

Las muestras se añadieron al tampón de carga (Tris 0.186 M, azul de bromofenol 0.25 mg/ml, β -mercaptoetanol 6 %, glicerol 15 % V:V y SDS 9 % P:V) y se sometieron a separación por peso molecular mediante electroforesis continua en condiciones desnaturalizantes en geles de poliacrilamida 10 % cargando 30- 40 μ g de proteína. Seguidamente se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa de 0.45 μ m mediante electrotransferencia. Para el inmunomarcaje, se bloqueó la membrana, con el fin de evitar uniones inespecíficas con T-TBS (Tris-HCl 20 mM pH 7.6; NaCl 137 mM con un 0.1 % (V:V) de Tween-20) con un 5 % de leche en polvo durante una hora a temperatura ambiente. Tras el bloqueo, la membrana se incubó con el anticuerpo correspondiente en la solución de bloqueo durante toda la noche y a 4 °C. La membrana se lavó abundantemente con TBS (Tris-HCl 20 mM pH 7.6; NaCl 137 mM) y se incubó durante una hora a temperatura ambiente con anticuerpos anti- IgM de ratón y anti- IgM de conejo conjugados con peroxidasa a una dilución 1: 1000 en la solución de bloqueo. Tras el lavado las bandas inmunorreactivas se visualizaron por el método de ECL de Amersham (detección por quimioluminiscencia). Las autoradiografías se valoraron por densitometría.

Las condiciones de incubación fueron: para el anticuerpo anti-GFAP (1:1000); anti- β -actina (1:5000); anti-TH (1:5000); anti- β -tubulina (1:10000); anti-Bclx_{S/L} (S-18) (1:500); anti-Bax (1:500); anti-Bcl2 (1:500); anti-CDCrel-1 (1:5000); anti-parkin (1: 500); anti-OX6 (1:500); anti-NSE (1:2000).

2.2.11. Determinación de proteínas

La determinación de proteínas se realizó siguiendo el método de BCA. El ensayo de BCA combina el principio de la reducción de iones Cu^{+2} a iones Cu^{+1} en presencia de medio alcalino (reacción de Biuret), con la alta sensibilidad de detección colorimétrica de los cationes Cu^{+1} . El producto de la reacción de este ensayo está formado por la interacción de dos moléculas de BCA con una molécula de ión cuproso Cu^{+1} . Este compuesto presenta absorbancia a una longitud de onda de 562 nm. Se realizó una curva patrón con albúmina de suero bovina (BSA) 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ con concentraciones crecientes desde 2.5 a 100 μM .

2.2.12. Determinación de monoaminas en los cultivos mesencefálicos

La concentración de Dihidroxifenilalanina (DOPA), dopamina (DA) y ácido 3,4-dihidroxifenilacético (DOPAC) en los cultivos celulares se determinó mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) con detección electroquímica (Coulchem), según el método descrito por Mena y col. (1989). Las células se recogen y se sonicán en 200- 500 μl de ácido perclórico 0.2 N que contiene metabisulfito sódico 0.5 mM y EDTA 0.26 mM. Se centrifugan durante 5 minutos a 12.000 rpm y el sobrenadante se filtra con un filtro de 0.45 μm de tamaño de poro. De este modo, queda en condiciones de ser inyectado en el sistema de HPLC. Todo el procesamiento de las muestras se realiza a 4 °C.

2.3. Experimentos “*in vivo*”

2.3.1. Animales utilizados y tratamiento

Trabajamos con ratones C57BL6/129SV tanto salvajes (WT) como mutantes para el gen *park-2* (PK-KO) obtenidos de los laboratorios de Aventis Pharma S.A. (Vitry- sur- Seine, France) (Itier et al., 2003). Toda la manipulación de los animales en el laboratorio se hizo acorde a las directrices de la Unión Europea. Nos esforzamos en usar el menor número de animales posibles y en minimizar su sufrimiento.

Para estos experimentos usamos 24 ratonas de 14 meses (12 ratonas WT y 12 ratonas PK-KO). De las 12 ratonas WT usamos 6 como controles y las otras 6 las tratamos con cinarizina. Los mismos grupos hacemos con las PK-KO. La cinarizina la administramos

durante 6 semanas en el agua a dosis de 10 mg/kg. La dosis de cinarizina ingerida por los ratones WT (175 ± 7.3 ml/kg/día) y PK-KO (169 ± 5.77 ml/kg/día) fue similar.

2.3.2. Estudios de comportamiento

Medimos la actividad motora en todos los animales durante 30 minutos (después de 30 minutos de adaptación), una vez a la semana. Para ello usamos un Actitrac (Panlab, Barcelona, España) consistente en un campo abierto (área: 45 x 45 cm.), con dos bandas de infrarrojos, separadas 2,5 cm., rodeando todo el campo acopladas a un sistema de control informático. Medimos distintos parámetros de comportamiento: 1) distancia recorrida en el actímetro; 2) tiempo que están moviéndose lentamente (velocidad < 5 cm/s); 3) tiempo de inactividad; 4) actividad exploratoria. El análisis de actividad motora se hizo durante periodos de 10 minutos.

2.3.3. Obtención de las regiones cerebrales y preparación del tejido

Después de decapitar a los animales, se diseccionaron las distintas regiones cerebrales de acuerdo a Carlsson y Lindqvist (1973); las regiones que son ricas en terminales DAérgicas (Sistema Límbico y Estriado) y en neuronas DAérgicas (mesencéfalo), se usaron para el estudio.

El genotipo de los ratones se confirmó haciendo un Western Blot para la proteína parkina usando un anticuerpo anti- parkina. También se comprobó haciendo un estudio genotípico por PCR extrayendo el ADN de un trozo (1 cm.) de la cola.

Las regiones cerebrales se congelaron en hielo seco, se sonicaron (VibraCell, nivel 2, durante 30 segundos) en 8 volúmenes (P:V) de ácido perclórico 0.4 N, $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ 0.5 mM y EDTA al 2 % y se centrifugaron a 12.000 rpm durante 20 minutos a 4 °C. El sobrenadante se usó para medir las monoaminas y sus metabolitos así como para determinar los niveles de glutatión.

El pellet, con las proteínas, se neutralizó (P:V=1:9) con un tampón de lisis (Na_2CO_3 0.75 %, SDS 2%, PMSF 0.25 mM, leupeptina 10 mg/ml, aprotinina 2 mg/ml, pepsina 10 mg/ml) y se sonicó y centrifugó a 12.000 rpm durante 30 minutos a 4 °C. El sobrenadante se usó para determinar la concentración de proteínas y para análisis de electroforesis.

2.4. Determinación de monoaminas y sus metabolitos

Los niveles de DA y sus metabolitos, 3-metoxi-tiramina (3-MT), ácido 3,4-dihidroxifenilacético (DOPAC) y ácido homovanílico (HVA), noradrenalina (NA) y su metabolito, 4-hidroxi-3-metoxi-fenil-glicol (MHPG), serotonina (5-HT) y su metabolito, ácido 5-hidroxi-indol-acético (5-HIAA), se midieron con la técnica de HPLC con un detector

electroquímico (Coulchem), de acuerdo a Mena et al., (1995). Brevemente, el tejido se sonicó en 8 volúmenes (P:V) con ácido perclórico 0.4 N, $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ 0.5 mM y EDTA 2 % y se centrifugó durante 10 minutos.

Las condiciones cromatográficas fueron: columna Nucleosil 5C18; una fase móvil, tampón citrato/acetato 0.1 M, pH 3.9 con metanol 10 %, EDTA 1 mM y ácido heptano sulfónico 1.2 mM; condiciones de las células electroquímicas de voltaje del detector: D1 (+0.05), D2 (-0.39) y la célula analítica (+0.40).

La actividad MAO se determinó siguiendo el método de Truong (1989). Se homogeniza el tejido (estriado) en cloruro potásico (0.9%). La mezcla de reacción contiene 100 μl del homogenado de tejido, 150 μl de tampón fosfato sódico (0.2 M), 25 μl de beta-NAD (2.8×10^{-3} M) y 25 μl de acetaldehído deshidrogenada (3.6 mg/ml). La reacción se inicia añadiendo 50 μl de sustrato e incubando 30 minutos a 37 °C. Se para esta reacción añadiendo una mezcla de ácido perclórico (4 N), metabisulfito sódico (10^{-4} M) y EDTA (2.5×10^{-4} M). Posteriormente se centrifugó y el sobrenadante se usa para el análisis de determinación de DOPAC por HPLC/ED. La actividad MAO- B se mide en nmoles/ mg proteína/ minuto.

2.5. Análisis estadístico de los datos

Los resultados se expresaron como media \pm error estándar de la media (SEM). Los análisis estadísticos se realizaron con el test de ANOVA de 1 ó 2 vías, seguido de un post-test de Newman-Keuls o de Bonferroni respectivamente, considerando significativa una diferencia cuando $p \leq 0.05$. Para facilitar el manejo y almacenamiento de los datos, se utilizó el programa informático PRISMA de GraphPad Software.

IV. RESULTADOS

Consideraciones previas a los estudios “in vitro” con cultivos primarios de mesencéfalo fetal de ratones salvajes y mutantes para el gen de la parkina.

La EP se caracteriza, principalmente, por la muerte de las neuronas DAérgicas del sistema nigroestriatal. En los ratones mutantes para el gen que codifica para la proteína parkina, la liberación de DA y su metabolismo están alterados, lo que conlleva un aumento en la producción de radicales libres (Itier et al., 2003). El estrés oxidativo parece jugar un papel fundamental en el desarrollo de la EP y conduce a la agregación de sinucleína y/o a una disfunción del proteasoma.

Las neuronas DAérgicas pueden ser más sensibles al proceso de la enfermedad que otras neuronas porque reciben un daño mayor a través del estrés oxidativo que se genera en el metabolismo de la DA.

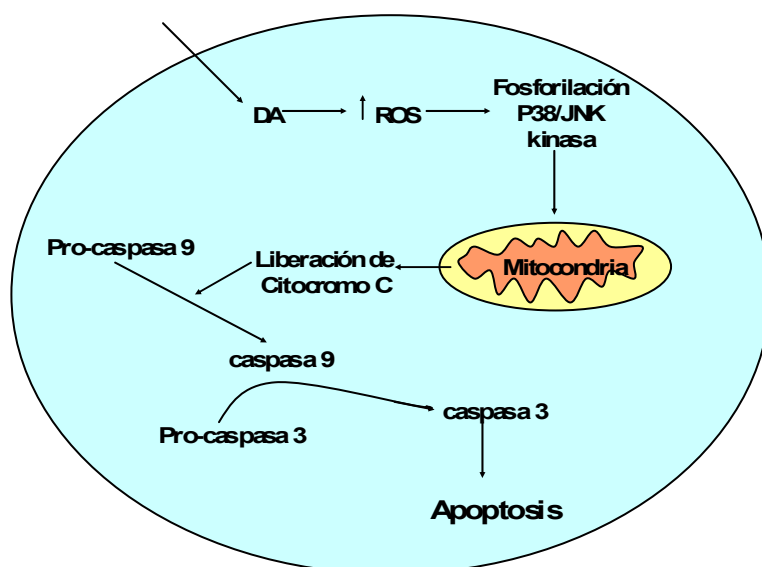


Figura 7. Cascada apoptótica inducida por DA. La DA, sintetizada por la misma célula o transportada a través de la membrana plasmática, genera ROS.

En la primera parte de este trabajo, nuestro objetivo se centrará en estudiar los efectos diferenciales del estrés oxidativo en cultivos primarios de mesencéfalo fetal (E13) enriquecidos en neuronas, tanto en ratones WT como PK-KO, sobre la supervivencia y muerte de las neuronas DAérgicas, la producción de GSH y el metabolismo de la DA, así como las vías que podrían estar implicadas en los distintos procesos de supervivencia y muerte neuronal.

Usamos tres neurotóxicos para producir el estrés oxidativo en cultivos mesencefálicos primarios: L-DOPA, rotenona y DEA/NO.

La L-DOPA (L-3,4-Dihidroxifenilalanina) es tóxica para las neuronas DAérgicas y células de neuroblastoma en cultivo “in vitro” (Mena et al., 1992; Mena et al., 1993; Mytilineou et al., 1993; Pardo et al., 1993; Pardo et al., 1995b; Pardo et al., 1995a), pero no se ha podido probar esa toxicidad en experimentos “in vivo” (Hefti et al., 1981; Dzieczapolski et al., 1997; Murer et al., 1998; Olanow et al., 2004). La mayoría de los experimentos “in vitro” en los que se demuestra la toxicidad de la L-DOPA se han hecho en ausencia de células gliales lo que nos llevó a hipotetizar que la presencia o ausencia de glía puede ser la causa de las discrepancias entre los resultados de los experimentos “in vitro” e “in vivo” (Mena et al., 1996). Así, el medio condicionado de glía (MCG) previene de la toxicidad inducida por la L-DOPA sobre las neuronas DAérgicas (Mena et al., 1996; Mena et al., 1997; Mena et al., 1998). Además, el tratamiento con L-DOPA de cocultivos de neuronas y glía hace que este compuesto tenga efectos neurotróficos (Mena et al., 1997).

El óxido nítrico (NO) tiene efectos neurotóxicos o neurotróficos dependiendo de las condiciones experimentales (estado REDOX celular, tipos celulares, dosis y tiempo de tratamiento). De este modo, hay autores que han demostrado que el NO es tóxico para las neuronas DAérgicas e induce su muerte (Dawson et al., 1992; Przedborski et al., 1996; LaVoie and Hastings, 1999; Liberatore et al., 1999; Canals et al., 2001b; Canals et al., 2001a; Rodríguez-Martín et al., 2002; Canals et al., 2003a; Canals et al., 2003b) mientras que otros trabajos demuestran que el NO incrementa la supervivencia y protege a las neuronas DAérgicas del estrés oxidativo (Lipton et al., 1993; Wink et al., 1996; Rauhala et al., 1998; Canals et al., 2001a). Los efectos neuroprotectores o neurotóxicos del NO pueden estar mediados por mecanismos REDOX (Lipton et al., 1993; Rodríguez-Martín et al., 2002) de modo que compuestos como el glutatión (GSH) pueden jugar papeles fundamentales en la modulación de los efectos del NO (Canals et al., 2001b; Canals et al., 2001a; Rodríguez-Martín et al., 2002; Canals et al., 2003a; Canals et al., 2003b). Como donador de NO usaremos un complejo sódico de dietilamina/ óxido nítrico (DEA/NO) que es un liberador rápido de NO.

La rotenona es un compuesto lipofílico que atraviesa libremente las membranas celulares y accede así a la mitocondria, donde inactiva el complejo I de la cadena respiratoria mitocondrial. “In vitro” produce apoptosis, cambios en el potencial de membrana mitocondrial, acumulación y agregación de α -sinucleína y ubiquitina y estrés oxidativo (Ryu et al., 2002; Ahmadi et al., 2003; Sherer et al., 2003a; Tada-Oikawa et al., 2003; Diaz-Corrales et al., 2005; Moon et al., 2005), procesos observados también en cerebros de pacientes parkinsonianos. La administración crónica de rotenona “in vivo” reproduce un modelo animal de EP en *Drosophila melanogaster* (Coulom and Birman, 2004) y en ratones

(Betarbet et al., 2000; Alam and Schmidt, 2002; Hoglinger et al., 2003; Sherer et al., 2003b; Bashkatova et al., 2004; Lapointe et al., 2004).

En la última parte del trabajo presentamos un modelo de parkinson “in vivo” usando cinarizina, un antagonista de calcio que se usa en el tratamiento de dolores de cabeza y vértigo, que produce parkinsonismo en pacientes con predisposición genética y en monos sanos tras su administración oral (Garcia-Ruiz et al., 1992a).

1. CARACTERIZACIÓN DE LOS CULTIVOS ENRIQUECIDOS EN NEURONAS MESENCEFÁLICOS FETALES (E13) PRIMARIOS.

Las células obtenidas del mesencéfalo de embriones E13 fueron mantenidas 7- 8 días en un medio Neurobasal suplementado con B27 y en ausencia de suero; tras ese periodo “in vitro”, la mayoría de las células (entre el 75- 80 %) son neuronas (MAP-2⁺), de las que un 1- 2 % de las mismas son neuronas DAérgicas (TH⁺) y el 10-15 % restante es glía; la mayoría de las células gliales son astrocitos (GFAP⁺), microglía (Isolectina B4⁺), progenitores gliales (A₂B₅) y oligodendrocitos (O1⁺). También encontramos progenitores neuronales (Nestina⁺).

Los cultivos enriquecidos en neuronas procedentes de ratones PK-KO tienen proporciones similares de los distintos grupos celulares que los cultivos WT, con la excepción de un aumento significativo de las células de microglía y de los progenitores gliales (Fig. 8 A).

El genotipo de los animales se verificó mediante análisis por Western Blot para la proteína parkina en los cultivos mesencefálicos usando un anticuerpo anti-parkina. Como control positivo se usó el estriado del cerebro de un ratón WT (Fig. 8 B).

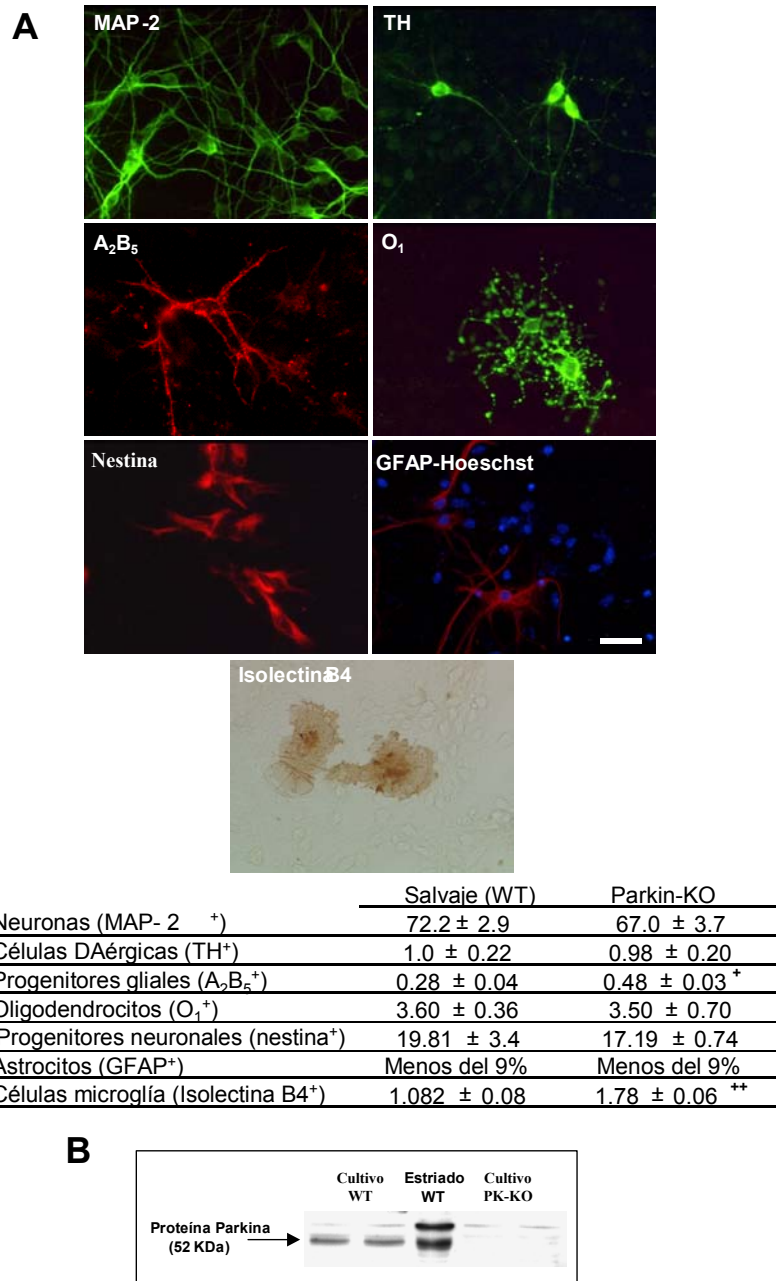


Figura 8. Caracterización celular de los cultivos mesencefálicos fetales primarios enriquecidos en neuronas procedentes de ratones salvajes (WT) y mutantes para la parkina (PK-KO). A) Las imágenes muestran neuronas (MAP-2⁺), células dopaminérgicas (TH⁺), progenitores gliales (A₂B₅⁺), oligodendrocitos (O₁⁺), progenitores neurales (Nestina⁺), astrocitos (GFAP⁺) comarcados con bis-benzimida, y células de microglía (Isolectina B4⁺) en cultivos mesencefálicos. Escala = 30 μm. Los valores se expresan como la media ± SEM de 6 replicados de 3 experimentos independientes. El análisis estadístico se hizo mediante un ANOVA de una vía seguido de un test Newman-Keuls. + p < 0.05; ++ p < 0.01 parkin-KO vs wild type. B) Análisis de la proteína parkina por Western blot en extractos obtenidos de cultivos mesencefálicos de E13 salvajes o PK-KO, usando la región del estriado de un cerebro de un ratón salvaje como control positivo.

2. EFECTOS DIFERENCIALES DE LA L-DOPA EN EL METABOLISMO DE LAS MONOAMINAS, LA SUPERVIVENCIA CELULAR Y LA PRODUCCIÓN DE GSH DE LOS CULTIVOS ENRIQUECIDOS EN NEURONAS DE RATONES WT Y PK-KO.

2.1 Efectos de la L-DOPA sobre la supervivencia y muerte de las neuronas DAérgicas.

Nuestro grupo ha descrito que la L-DOPA, en los cultivos mesencefálicos primarios enriquecidos en neuronas de rata E14, produce efectos neurotóxicos sobre las neuronas DAérgicas presentes en el cultivo (Mena et al., 1993; Mena et al., 1996). Al realizar un estudio inmunocitoquímico para la detección de neuronas DAérgicas en el cultivo primario mesencefálico de ratón E13, el tratamiento con L-DOPA redujo el número de neuronas DAérgicas un 48 % respecto al grupo control en los cultivos procedentes de los ratones WT (Fig. 9 A, B). Además, el tratamiento produce un incremento en la apoptosis, valorada mediante una tinción inmunocitoquímica de los núcleos presentes en el cultivo con bis-benzimida, del doble de los valores basales en dichos cultivos (Fig. 9 C, D). Sorprendentemente, los cultivos procedentes de los ratones PK-KO no sólo son resistentes a los efectos pro- apoptóticos inducidos por el tratamiento con L-DOPA sino que, presentan un aumento significativo en el número de neuronas DAérgicas (Fig. 9 A- D), lo que sugiere que la L-DOPA, incluso a una concentración elevada (400 μ M), es tóxica para las neuronas de los cultivos mesencefálicos primarios procedentes de ratones WT pero no para las de los PK-KO.

Otro método muy usado para realizar la valoración de la apoptosis que se produce en un cultivo es la técnica de TUNEL. Similarmente a los resultados obtenidos al valorar la apoptosis haciendo un marcaje nuclear con bis- benzimida, en los cultivos WT vemos un incremento muy significativo (270%) de las células TUNEL⁺ apoptóticas en el grupo tratado con L-DOPA versus el grupo control (Fig 9 F) y además comprobamos que las neuronas DAérgicas son uno de los tipos celulares presentes en el cultivo que está siendo afectado por el tratamiento con L-DOPA como se muestra al producirse un comarcaje de células TH⁺/TUNEL⁺ (Fig. 9 E). Los cultivos PK-KO son resistentes a la apoptosis inducida por la L-DOPA.

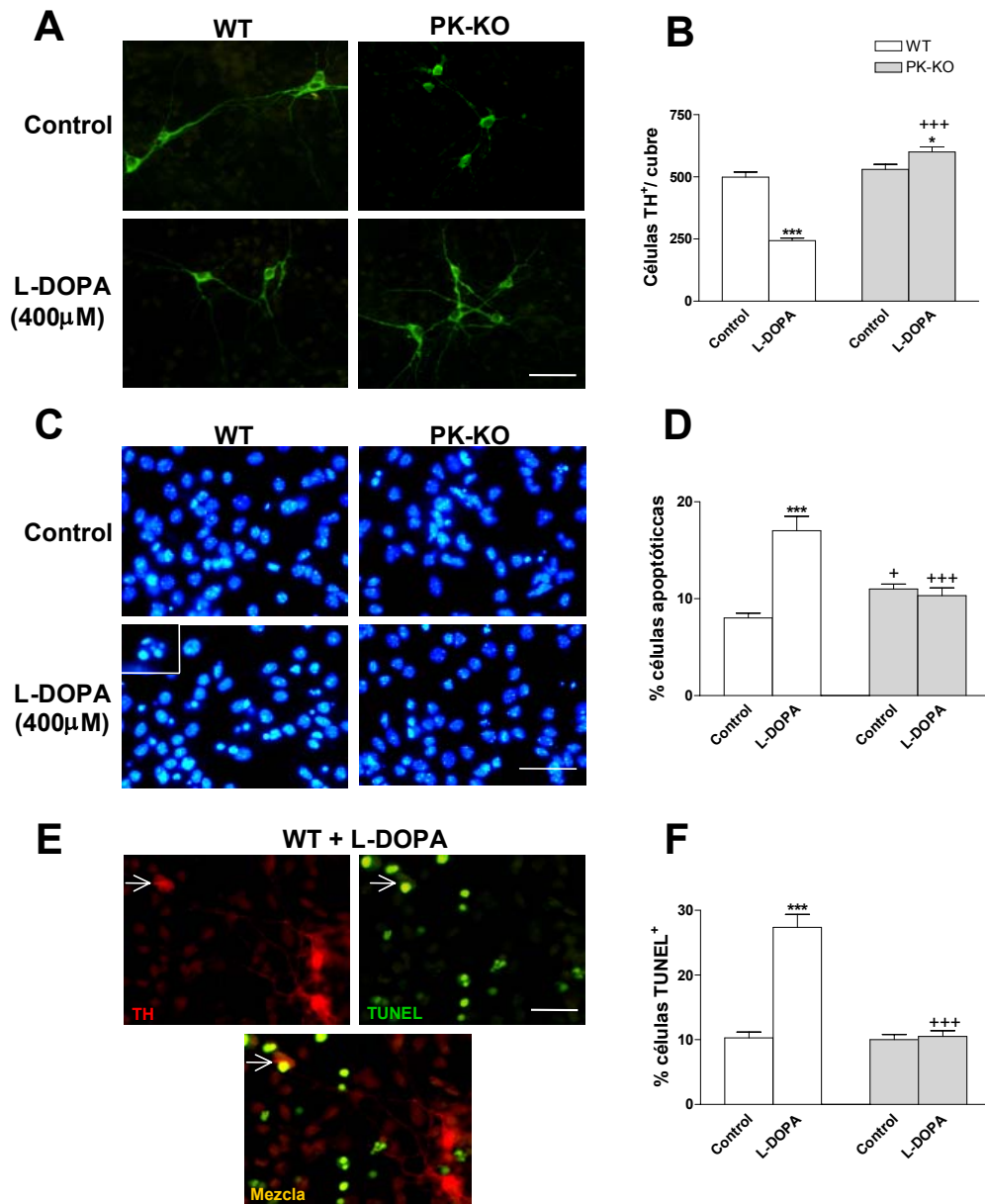


Figura 9. Efectos de la L-DOPA sobre neuronas DAérgicas y muerte celular apoptótica en cultivos mesencefálicos WT y PK-KO. Después de 7 DIV, las células se trataron con L-DOPA 400 μ M durante 24 h. A) Fotografías de neuronas DAérgicas (células TH⁺). Escala = 30 μ m. B) Histograma representativo del número de neuronas DAérgicas (células TH⁺ por pocillo). C) Fotografías de núcleos totales marcados con bis-benzimida de WT y PK-KO de cultivos control y tratados con L-DOPA (400 μ M). D) Porcentaje de células apoptóticas. E) Imágenes del comarcaje de neuronas TH⁺/TUNEL⁺. F) Porcentaje de células TUNEL⁺. Los valores se expresan como la media \pm SEM de 6 replicados procedentes de 3 experimentos diferentes. El análisis estadístico se hizo mediante un ANOVA de 1 vía seguido de un test de Newman-Keuls. * $p < 0.05$; *** $p < 0.001$ cultivos tratados con L-DOPA vs controles; +++ $p < 0.001$ cultivos PK-KO vs WT.

2.2 Estudio de las vías implicadas en la muerte celular inducida por la L-DOPA.

Hemos estudiado los posibles mecanismos implicados en los efectos de la L-DOPA sobre los cultivos neuronales de WT y PK-KO. Estos mecanismos se desconocen parcialmente pero hay trabajos que sugieren que los efectos neurotróficos o neurotóxicos de algunos compuestos pueden estar mediados a través de las rutas de señalización de las proteínas quinasa activada por mitógenos (MAPK) o del fosfatidil inositol 3 quinasa (PI3-quinasa) (Brunet et al., 2001; Canals et al., 2003a; Canals et al., 2003b; de Bernardo et al., 2003; de Bernardo et al., 2004). La familia de las ERK/MAPK es una familia de quinastas que participan en numerosos procesos entre los que destacan la división y diferenciación celular y la degeneración neuronal (Seeger and Krebs, 1995). Se ha descrito que la inhibición de la vía ERK/MAPK protege frente al estrés oxidativo en cultivos primarios de neuronas corticales (Coyle and Puttfarcken, 1993).

Por otro lado, la vía de las PI3- quinastas está relacionada con la inactivación de proteínas pro- apoptóticas y también con una disminución de especies reactivas de oxígeno (ROS) inducidas por un estrés causado con 6OH-DA (Salinas et al., 2003).

Teniendo en cuenta estos estudios nos planteamos si alguna de estas dos vías estaría jugando algún papel en la muerte de las neuronas DAérgicas inducida por la L-DOPA.

En la figura 10 (A y B) se representan los resultados obtenidos al inhibir la vía de las MAPK (con el inhibidor específico PD 98059) y la vía de las PI3-quinastas (usando el inhibidor específico LY 294002). Después de 6 DIV se añaden los inhibidores treinta minutos antes de realizar el tratamiento con L-DOPA. No se observa ningún efecto significativo al valorar la supervivencia de las neuronas TH⁺ mediante técnicas inmunocitoquímicas después de tratar los cultivos con los inhibidores, lo que nos indica que ninguna de las dos vías está implicada en los efectos tóxicos de la L-DOPA sobre los cultivos WT.

Por otro lado, la muerte celular por apoptosis viene precedida por una activación de la cascada de la vía de las caspasas por lo que decidimos estudiar el efecto de la inhibición de esta ruta usando un inhibidor de amplio espectro de la ruta de las caspasas, el Boc-D-FMK, a una concentración de 30 μ M y añadiéndolo treinta minutos antes de tratar el cultivo con L-DOPA.

Hicimos un ensayo inmunohistoquímico para detectar la muerte apoptótica de los cultivos mediante la técnica de TUNEL. En la figura 10 C, vemos que la inhibición de la ruta de las caspasas protege totalmente los cultivos WT de la muerte neuronal inducida por la L-DOPA, lo que nos indica que la L-DOPA desencadena la activación de la vía de las caspasas que conduce a una muerte celular apoptótica.

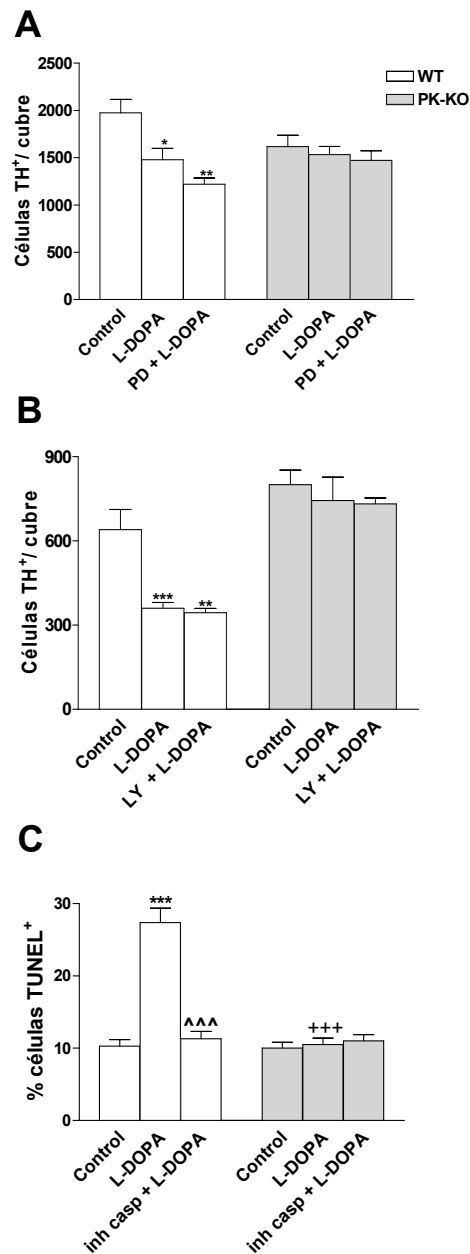


Figura 10. Rutas de señalización implicadas en los efectos de la L-DOPA sobre los cultivos WT y PK-KO. Después de 7 DIV, las células se trataron con L-DOPA 400 μ M durante 24 h, y 30 minutos antes del tratamiento, los grupos preestablecidos se trataron respectivamente con el inhibidor de MEK-1/2, PD 98059 (20 μ M) (A), el inhibidor específico de PI3K, LY 294002 (30 μ M) (B) o el inhibidor de amplio espectro de la ruta de las caspasas Boc-D-FMK (30 μ M) (C). Los valores se expresan como la media \pm SEM de 6 replicados de seis experimentos independientes. El análisis estadístico se hizo mediante un ANOVA de 1 vía seguido de un test Newman-Keuls. ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ cultivos tratados con L-DOPA vs controles; +++ $p < 0.001$ PK-KO vs WT.

2.3 Valoración de los niveles de L-DOPA, DA y actividad MAO-B en los cultivos mesencefálicos WT y PK-KO tratados con L-DOPA.

En la figura 11 A y B representamos el metabolismo de la DA en los cultivos de ratones WT y PK-KO tratados con L- DOPA. Los niveles intracelulares de L-DOPA son iguales en cultivos WT y PK-KO por lo que la captación intracelular de este compuesto es similar en ratones WT y PK-KO. Por otro lado, los niveles intra y extracelulares de DA y DOPAC están aumentados significativamente en los ratones PK-KO. Además, el cociente DOPAC/DA, al igual que la actividad MAO-B en el estriado de ratones adultos, está incrementado significativamente en los cultivos mesencefálicos neuronales fetales y en el estriado de ratones adultos PK-KO (Fig. 11 C), lo que demuestra que los ratones PK-KO tienen incrementado el metabolismo de la DA en los cultivos mesencefálicos fetales (E13).

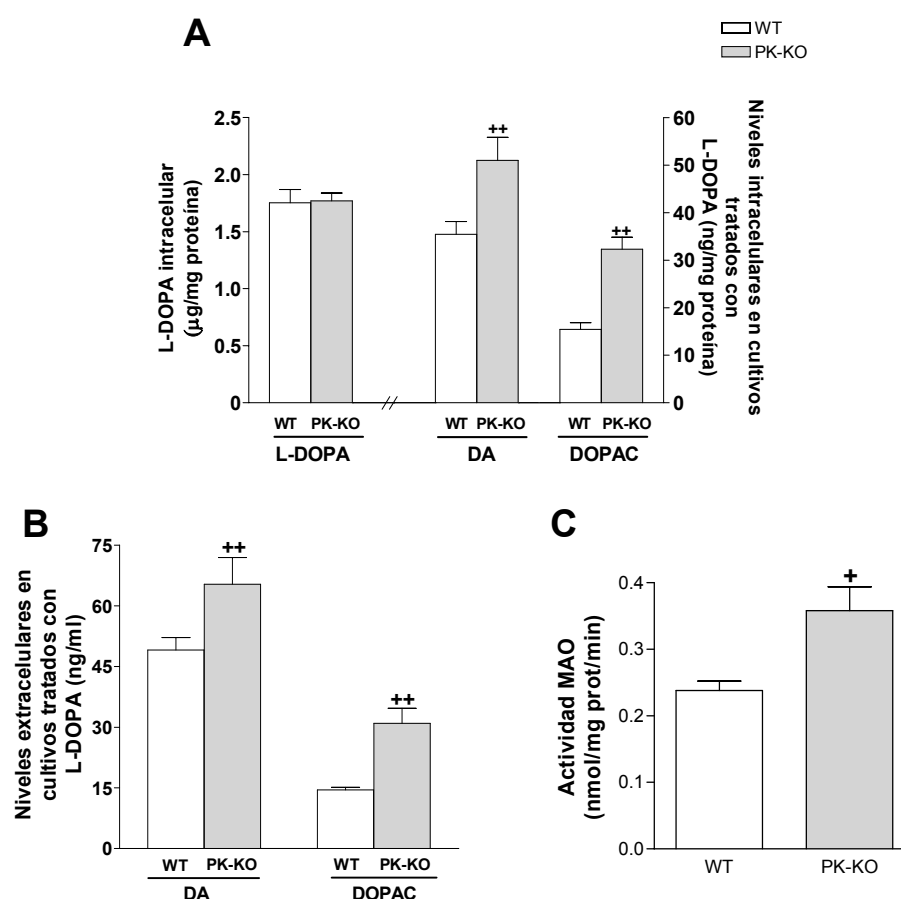


Figura 11. Niveles de L-DOPA, DA, DOPAC y actividad MAO en cultivos mesencefálicos WT y PK-KO tratados con L-DOPA. Después de 8 DIV, las células se trataron con L-DOPA 400 µM durante 4 h. A) Niveles intracelulares de L-DOPA, DA y DOPAC después de 4 h de tratamiento. B) Niveles extracelulares de DA y DOPAC después de 4 h de tratamiento. C) Actividad MAO en el estriado expresada en nmol/mg prot/min. Los valores se expresan como la media ± SEM de 6 replicados de seis experimentos independientes. El análisis estadístico se hizo mediante un ANOVA de 1 vía seguido de un test Newman-Keuls. + $p < 0.05$; ++ $p < 0.01$ PK-KO vs WT.

2.4 Efecto del tratamiento con L-DOPA sobre los niveles intracelulares de GSH.

La homeostasis del GSH es muy importante para la defensa celular frente al estrés oxidativo. El GSH es una molécula antioxidante que juega un papel fundamental en la neutralización de las ROS y lleva a cabo su función a través de dos mecanismos: de forma no enzimática, reaccionando directamente con los radicales libres y de forma enzimática, siendo sustrato de la enzima glutathion peroxidasa.

En el metabolismo de la DA se producen ROS por lo que es muy importante conocer los niveles de GSH intracelular que tenemos en los cultivos neuronales primarios procedentes tanto de los ratones WT como PK-KO.

Al valorar los niveles de GSH intracelular, vemos que los cultivos procedentes de ratones PK-KO tienen unos niveles mayores de GSH tanto basalmente, como después de realizar el tratamiento con la L-DOPA. Esto nos indica que los cultivos procedentes de ratones PK-KO tienen una mayor protección frente al efecto del estrés oxidativo. En ambos cultivos, el tratamiento con L-DOPA reduce los niveles de GSH aunque no es una disminución significativa (Fig. 12).

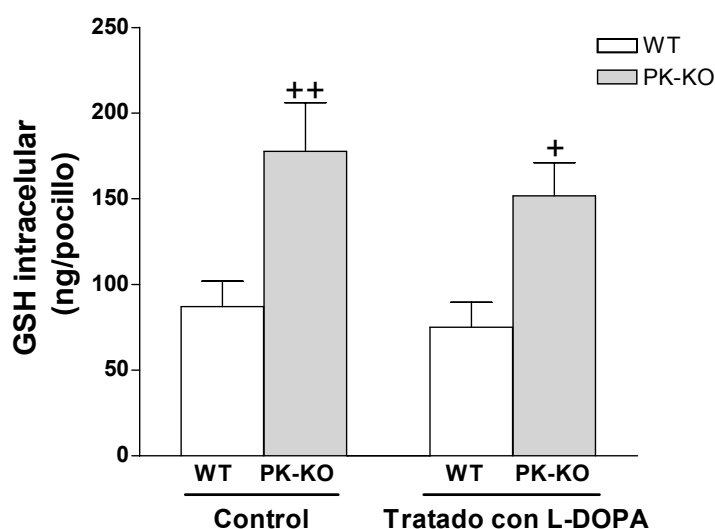


Figura 12. Niveles de GSH intracelular en los cultivos mesencefálicos primarios de WT y PK-KO. Los valores se expresan como la media \pm SEM de 6 replicados de seis experimentos independientes. El análisis estadístico se hizo mediante un ANOVA de 1 vía seguido de un test Newman Keuls. + $p < 0.05$, ++ $p < 0.01$ PK-KO vs WT.

2.5 Efecto de la inhibición de la síntesis de GSH en el tratamiento de los cultivos WT y PK-KO con L-DOPA.

Para saber si el GSH juega un papel en el efecto diferencial de la L-DOPA en cultivos WT y PK-KO, hacemos un pre- tratamiento con L-butionina-(S,R)-sulfoximina (BSO) que es un compuesto que inhibe el enzima limitante en la síntesis de GSH. A los 6 DIV añadimos el BSO a una concentración de 3 μ M durante 24 horas. Este tratamiento disminuye la concentración de GSH de 2.9 a 0.8 ng/ mg proteína aunque no induce la muerte de las neuronas DAérgicas. Al día siguiente tratamos los cultivos con L-DOPA 400 μ M durante 24 horas. En los cultivos WT, el cotratamiento con BSO y L-DOPA incrementa significativamente la muerte de las neuronas DAérgicas respecto al grupo control y más aún que al tratar sólo con L-DOPA (Fig. 13 A). Al valorar el porcentaje de células apoptóticas presentes en el cultivo vemos que el cotratamiento aumenta el porcentaje de células apoptóticas un 154 % respecto al grupo control y un 120 % respecto al grupo tratado únicamente con L-DOPA. Al estudiar los resultados obtenidos en los cultivos PK-KO vemos que el cotratamiento con BSO y L-DOPA produce una reducción en el número de neuronas DAérgicas del 68 % respecto a los controles y del 66 % respecto al grupo tratado sólo con L-DOPA. También observamos un aumento significativo al valorar el porcentaje de células apoptóticas (Fig. 13 B). La inhibición de la síntesis de GSH bloquea el efecto diferencial de la L-DOPA en cultivos mesencefálicos WT y PK-KO.

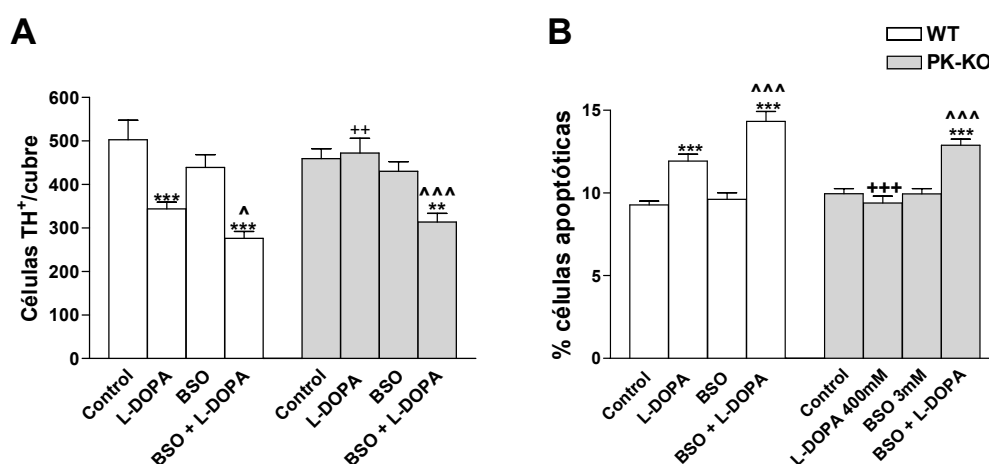


Figura 13. La inhibición de GSH bloquea la respuesta diferencial frente a L-DOPA de los cultivos WT y PK-KO. Después de 6 DIV, los grupos celulares preestablecidos se pre-trataron con el inhibidor de GSH (BSO, 3 μ M) durante 24 h. Al día siguiente, se tratan los cultivos con L-DOPA 400 μ M o solvente durante otras 24 h. A) Neuronas DAérgicas expresadas como células TH⁺/cubre, en cultivos WT y PK-KO; B) Porcentaje de núcleos apoptóticos. Los valores se expresan como la media \pm SEM de 6 replicados de seis experimentos independientes. El análisis estadístico se hizo mediante un ANOVA de 1 vía seguido de un test Newman Keuls. ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ cultivos tratados con L-DOPA vs controles; ++ $p < 0.01$, +++ $p < 0.001$ PK-KO vs WT; ^ $p < 0.05$, ^^^ $p < 0.001$ tratamiento con BSO + L-DOPA vs tratamiento con L-DOPA.

3. LOS CULTIVOS PROCEDENTES DE RATONES PK-KO SON RESISTENTES A LA TOXICIDAD INDUCIDA POR UN DONADOR DE ÓXIDO NÍTRICO (DEA/NO).

3.1 Efectos diferenciales del DEA/NO sobre la supervivencia y muerte de las neuronas DAérgicas.

El estrés oxidativo es un factor que juega un papel importante en la EP. Uno de los radicales libres que participa de manera importante en la muerte de las neuronas DAérgicas es el óxido nítrico (NO). El NO participa tanto en la muerte (Smith et al., 1994; Przedborski et al., 1996; LaVoie and Hastings, 1999; Liberatore et al., 1999) como en la supervivencia de las neuronas dopaminérgicas (Lipton et al., 1993; Wink et al., 1996; Rauhala et al., 1998; Canals et al., 2001a). Un aumento en la producción de NO puede producirse por un incremento en la síntesis del enzima óxido nítrico sintasa inducible (iNOS) presente en las células gliales, o por un aumento de calcio intracelular que activa dos enzimas constitutivos: NOS neuronal (nNOS) o NOS endotelial (eNOS). La concentración local de NO está en función de la relación entre su producción y su desaparición, bien por reacción o por difusión (Murphy, 1999). Cuando la concentración de NO se eleva, puede causar daño celular por diversos mecanismos: (1) formando S-nitrosotioles, (2) reaccionando con el radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$) para formar peroxinitrito ($ONOO^{\cdot-}$), una molécula mucho más reactiva y citotóxica que la precursora, (3) desregulando enzimas con grupo hemo y (4) liberando hierro de la proteína intracelular ferritina.

Una de las dianas principales donde el NO ejerce sus efectos es la mitocondria y actúa sobre ella inhibiendo, reversible o irreversiblemente, la respiración mitocondrial, inhibiendo la creatina kinasa e induciendo la permeabilidad mitocondrial transitoria (Murphy, 1999). El NO puede así afectar tanto a la cantidad como al reclutamiento en la membrana mitocondrial externa de proteínas pro-apoptóticas (Bax, Bcl-X_S, Bak) y anti-apoptóticas (Bcl-2, Bcl-X_L) (Hsu et al., 1997; Levine, 1997).

En estudios previos hechos en el laboratorio hemos visto que el NO produce efectos neurotróficos o neurotóxicos dependiendo de la dosis (Canals et al., 2001a). Usando como donador de NO el DEA/NO hemos visto que a dosis bajas (25-50 μ M) este compuesto ejerce un efecto neurotrófico mientras que a dosis altas (200-400 μ M) produce neurotoxicidad.

Tratamos los cultivos primarios mesencefálicos WT y PK-KO con DEA/NO (400 μ M x 24 h.) y vemos el efecto del NO sobre las neuronas DAérgicas (Fig. 14 A) mediante técnicas inmunocitoquímicas usando un anticuerpo anti-TH. El NO ejerce un efecto tóxico sobre las neuronas DAérgicas de los cultivos WT en los que observamos una disminución del número de neuronas en el grupo tratado con DEA/NO del 53 % respecto al control, pero no sobre las

de los cultivos PK-KO en los que observamos una disminución en el número de neuronas DAérgicas pero no es significativo (Fig. 14 A, B).

El tratamiento con DEA/NO incrementó el porcentaje de células apoptóticas, detectadas en el cultivo por la condensación y fragmentación de la cromatina con un marcaje del núcleo con bis- benzimida, un 176 % en el grupo tratado *versus* control en el cultivo WT, mientras que en los cultivos PK-KO no vemos un aumento significativo del porcentaje de células apoptóticas (Fig. 14 C, D). Al valorar si en los cultivos WT y PK-KO se produce muerte por necrosis usando una técnica en la que medimos la actividad de la enzima lactato deshidrogenasa, que se libera al medio al producirse la rotura de la membrana citoplasmática, vimos que en los cultivos WT se produce un aumento significativo de la muerte celular por necrosis, efecto que no se observa en los cultivos PK-KO (Fig. 14 E).

En la figura 14 F comprobamos que la concentración de nitritos en los cultivos WT y PK-KO tratados con DEA/NO es prácticamente la misma lo que nos indica que la concentración de NO liberada por el donador es la misma en los cultivos WT y PK-KO y no explica el efecto diferencial del NO en los cultivos WT y PK-KO.

3.2 Patrón del fenotipo celular afectado por el DEA/NO en los cultivos mesencefálicos.

Como hemos visto, el DEA/NO causa la muerte de las neuronas DAérgicas presentes en los cultivos WT. Para confirmar este dato, hicimos una captación de alta afinidad de ^3H -DA que nos indica el número de neuronas DAérgicas que se encuentran en un estado funcional (Fig. 15 A). Dicha captación se ve disminuida un 67 % respecto al grupo control lo que nos confirma que el DEA/NO está afectando a la supervivencia y a las terminales presinápticas de las neuronas DAérgicas en los cultivos WT.

Por otro lado, al estudiar el efecto del DEA/NO sobre el resto de la población neuronal en el cultivo WT, vemos que el donador de NO también ejerce un efecto tóxico sobre las neuronas GABAérgicas, que son el tipo neuronal mayoritario presente en el cultivo. En la figura 15 B vemos una valoración de la actividad de dichas neuronas mediante una captación de alta afinidad de ^3H -GABA en el cultivo WT. La captación se ve reducida en un 68 % respecto a los controles lo que nos indica que el donador está ejerciendo un efecto neurotóxico sobre las neuronas GABAérgicas.

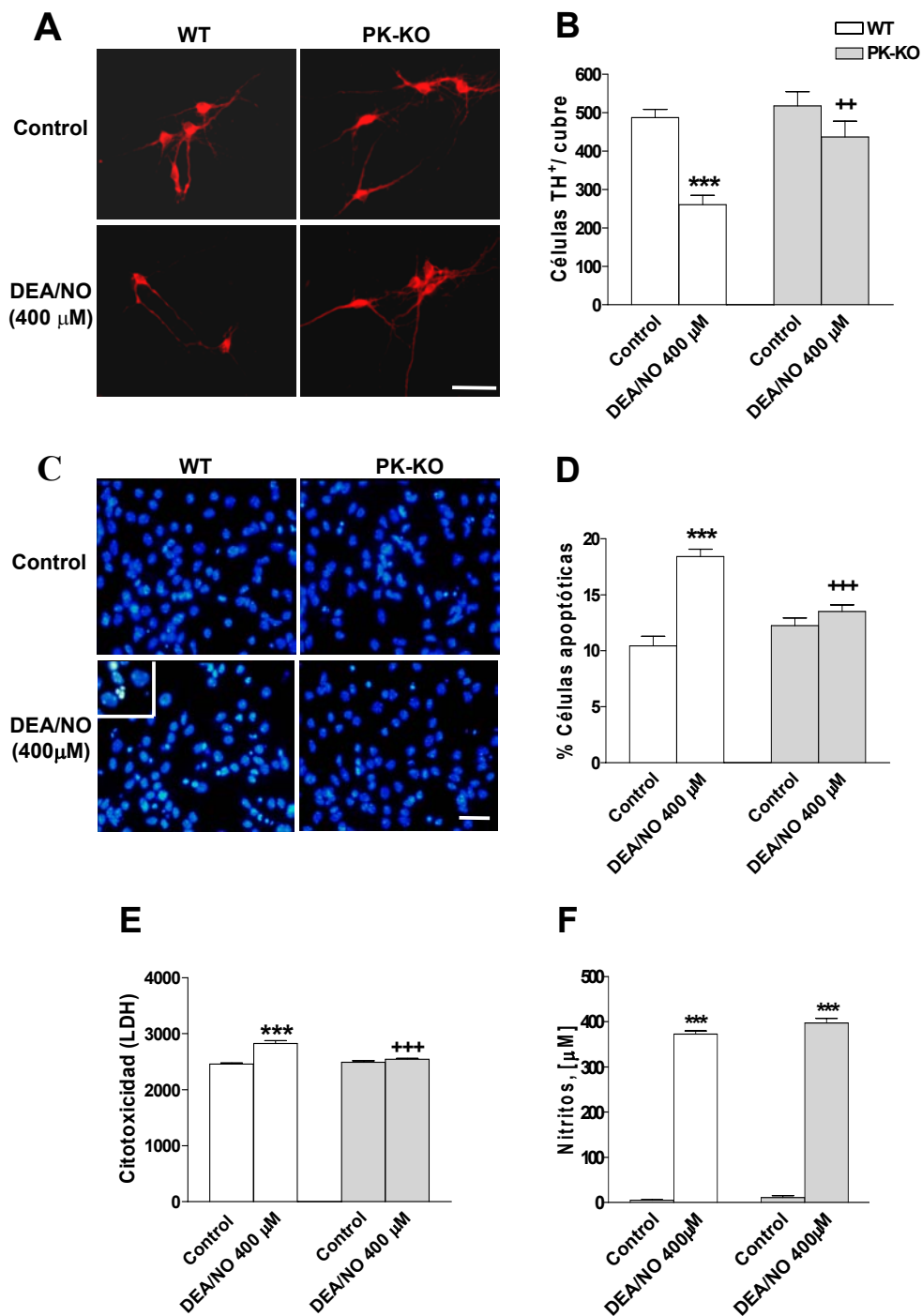


Figura 14. Efectos del DEA/NO sobre las neuronas DAérgicas y la muerte celular de los cultivos mesencefálicos. Después de 7 DIV, las células se trataron con DEA/NO 400 μM durante 24 h. A) Imágenes de las células DAérgicas (células TH⁺) en cultivos control y tratados con DEA/NO de WT (izquierda) y PK-KO (derecha). Escala = 30 μm. B) Número de células DAérgicas valoradas como células TH⁺/ cubre. C) Imágenes de los núcleos marcados con bis-benzimida de los cultivos WT (izquierda) y PK-KO (derecha) controles y tratados. Escala = 30 μm. El inserto nos muestra una célula apoptótica a mayor aumento. D) Porcentaje de la apoptosis en el cultivo. E) Actividad LDH. F) Concentración de nitritos en los cultivos control y tratados con DEA/NO en controles y PK-KO. Los valores se expresan como la media ± SEM de 6 replicados de tres experimentos diferentes. Para el análisis estadístico usamos un ANOVA de dos vías (la interacción entre genotipo y tratamiento fue p<0.05) seguido de un test de Bonferroni. *** p< 0.001 cultivos tratados con DEA/NO vs control. ++ p< 0.01; +++ p< 0.001 cultivos PK-KO vs WT.

El mismo efecto lo observamos al hacer una valoración por inmunocitoquímica usando un anticuerpo anti-MAP-2 (proteína asociada a los microtúbulos de las neuronas) que marca la totalidad de las neuronas presentes en el cultivo. Al valorar el área ocupada por las neuronas, observamos que el DEA/NO reduce el área de neuronas MAP-2⁺ de forma muy significativa en los cultivos tratados con el donador de NO respecto al grupo control WT (Fig. 15 C).

Así, vemos que la muerte inducida por el DEA/NO afecta principalmente a las neuronas presentes en los cultivos WT y lo confirmamos al hacer un comarcarje inmunocitoquímico usando un anticuerpo anti-NeuN (que marca el núcleo de las neuronas) junto con una tinción de los núcleos con bis-benzimida. Vemos que prácticamente todas las células que son apoptóticas (identificadas por la condensación o fragmentación de la cromatina) como consecuencia del tratamiento con DEA/NO, comarcan con células NeuN⁺ (Fig. 15 D). En los cultivos PK-KO tratados con el donador de NO no se observa una reducción en la captación de ³H-DA, ³H-GABA ni tampoco en la valoración del área MAP-2 (no mostrado).

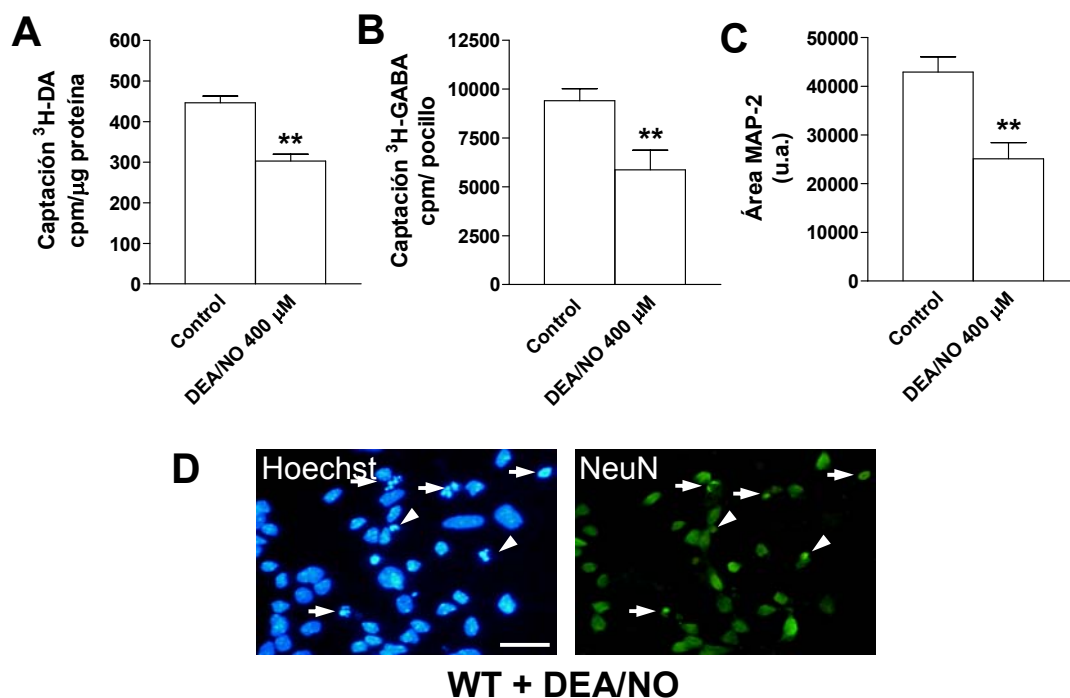


Figura 15. Efecto del DEA/NO sobre la muerte de las neuronas de los cultivos mesencefálicos de ratones WT. Después de 7 DIV, las células se trataron con DEA/NO 400 μM durante 24 h. A) Captación de alta afinidad de ³H-DA. B) Captación de alta afinidad de ³H-GABA. C) Neuronas totales en el cultivo expresadas como área de células MAP-2⁺. D) Imágenes de los núcleos teñidos con bis-benzimida que comarcan con células NeuN⁺, correspondientes al mismo campo, de cultivos WT tratados con DEA/NO. Los valores se expresan como la media ± SEM de 6 replicados de tres experimentos diferentes. Para el análisis estadístico usamos un ANOVA de una vía seguido de un test de Newman-Keuls. ** p < 0.01 cultivos tratados con DEA/NO vs control. u.a. unidades arbitrarias.

En cuanto a la población de las células gliales, haciendo una inmunocitoquímica con un anticuerpo anti-Isolectina B4 que revela las células de microglía (Fig. 16 A), vemos que los cultivos mesencefálicos procedentes de ratones PK-KO tienen unos niveles basales de microglía mayores que los WT (168 %). En los cultivos WT el tratamiento con DEA/NO produce un incremento de las células de microglía (Fig. 16 A, B) de un 215 % respecto al grupo control mientras que no observamos incremento de esta población celular en los cultivos PK-KO. En los cultivos WT vemos que se produce una disminución significativa de la población de astrocitos medida como área GFAP (de un 59 %) en el grupo tratado con el donador de NO. Por el contrario, y al igual que sucede con las células de microglía, en los cultivos PK-KO no se observa disminución alguna (Fig. 16 C).

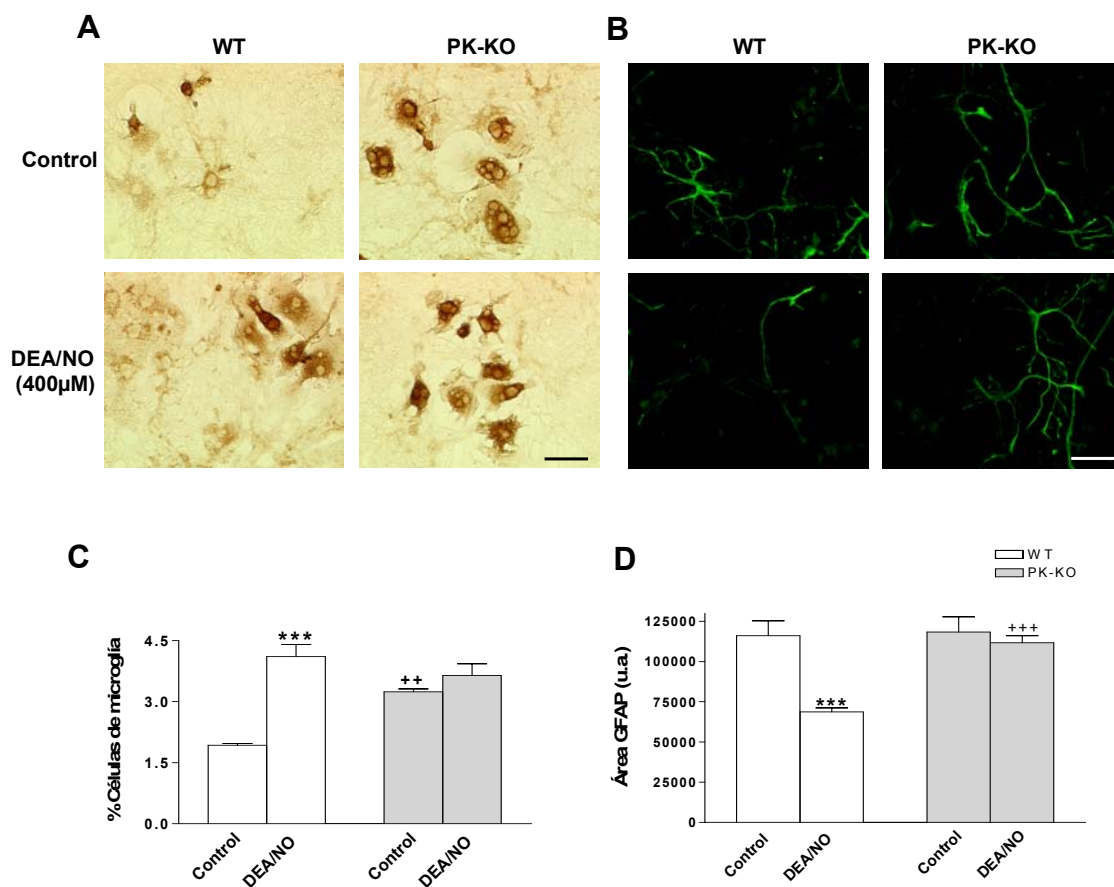


Figura 16. Efectos del tratamiento con DEA/NO sobre las células gliales. Después de 7 DIV, las células se trataron con DEA/NO 400 μ M durante 24 h. A) Imágenes de células de microglía (células teñidas con isolectina B4⁺). Escala = 30 μ m. B) Imágenes de los astrocitos (células teñidas con GFAP). Escala = 30 μ m. C) Porcentaje de células de microglía presentes en el cultivo. D) Área de astrocitos (GFAP⁺) en los cultivos. Los valores se expresan como la media \pm SEM de 6 replicados de tres experimentos diferentes. Para el análisis estadístico usamos un ANOVA de dos vías (la interacción entre genotipo y tratamiento fue $p < 0.001$) seguido de un test de Bonferroni. *** $p < 0.001$ cultivos tratados con DEA/NO vs control. ++ $p < 0.01$; +++ $p < 0.001$ cultivos PK-KO vs WT. u.a. unidades arbitrarias.

3.3 Estudio de las rutas intracelulares implicadas en la muerte celular inducida por el DEA/NO.

Como hemos descrito en el caso de la L-DOPA, la inhibición de la vía ERK/MAPK protege frente al estrés oxidativo en cultivos primarios de neuronas corticales (Coyle and Puttfarcken, 1993). Con el donador de NO estamos induciendo una situación de estrés oxidativo en los cultivos. Para ver si está implicada la ruta de las MAPK en la muerte del cultivo WT usamos un inhibidor de dicha ruta (PD 98059). Como se muestra en las figuras 17 A, B y C, el tratamiento con el inhibidor (20 μ M) media hora antes del tratamiento con DEA/NO, no protege de la disminución de células DAérgicas (Fig. 17 A) ni revierte la apoptosis general del cultivo (Fig. 17 B). Además, al hacer un ensayo de MTT para ver la actividad mitocondrial de las células presentes en el cultivo, vemos que el PD 98059 tampoco protege de la toxicidad inducida por el donador de NO.

Para estudiar la posible implicación de la vía de las caspasas en la muerte inducida por el DEA/NO en nuestro modelo usamos un inhibidor de amplio espectro de la ruta de las caspasas (Boc-D-FMK 30 μ M) que añadimos al cultivo treinta minutos antes del tratamiento con DEA/NO y vemos que protege, parcialmente, de la muerte apoptótica del cultivo WT, tanto al valorar el porcentaje de células apoptóticas mediante un ensayo inmunohistoquímico marcando los núcleos celulares con bis-benzimida, como al cuantificar las células apoptóticas mediante un ensayo de TUNEL (Fig. 17 D).

Además, podemos decir que la apoptosis que se produce en el cultivo está en una fase avanzada ya que, todos los núcleos que identificamos como apoptóticos en el marcaje con bis-benzimida, son núcleos TUNEL⁺ lo que implica una fragmentación de la cromatina (Fig. 17 E).

3.4 Efecto del DEA/NO sobre la homeostasis del GSH.

El GSH juega un papel fundamental en la neutralización de los efectos tóxicos que produce el estrés oxidativo. Por eso es muy importante conocer los niveles intracelulares de GSH en los cultivos WT y PK-KO. Como hemos descrito previamente, los niveles intracelulares basales de GSH en los cultivos primarios PK-KO son mayores que en los WT (124 %).

Al tratar los cultivos con DEA/NO, los niveles de GSH en los cultivos WT descienden de manera muy significativa respecto al grupo control (Fig. 18 A). Los cultivos PK-KO también sufren una disminución importante en los niveles de GSH al tratar con el donador de NO pero siguen teniendo unos niveles superiores respecto al grupo tratado con DEA/NO en los cultivos WT (Fig. 18 A).

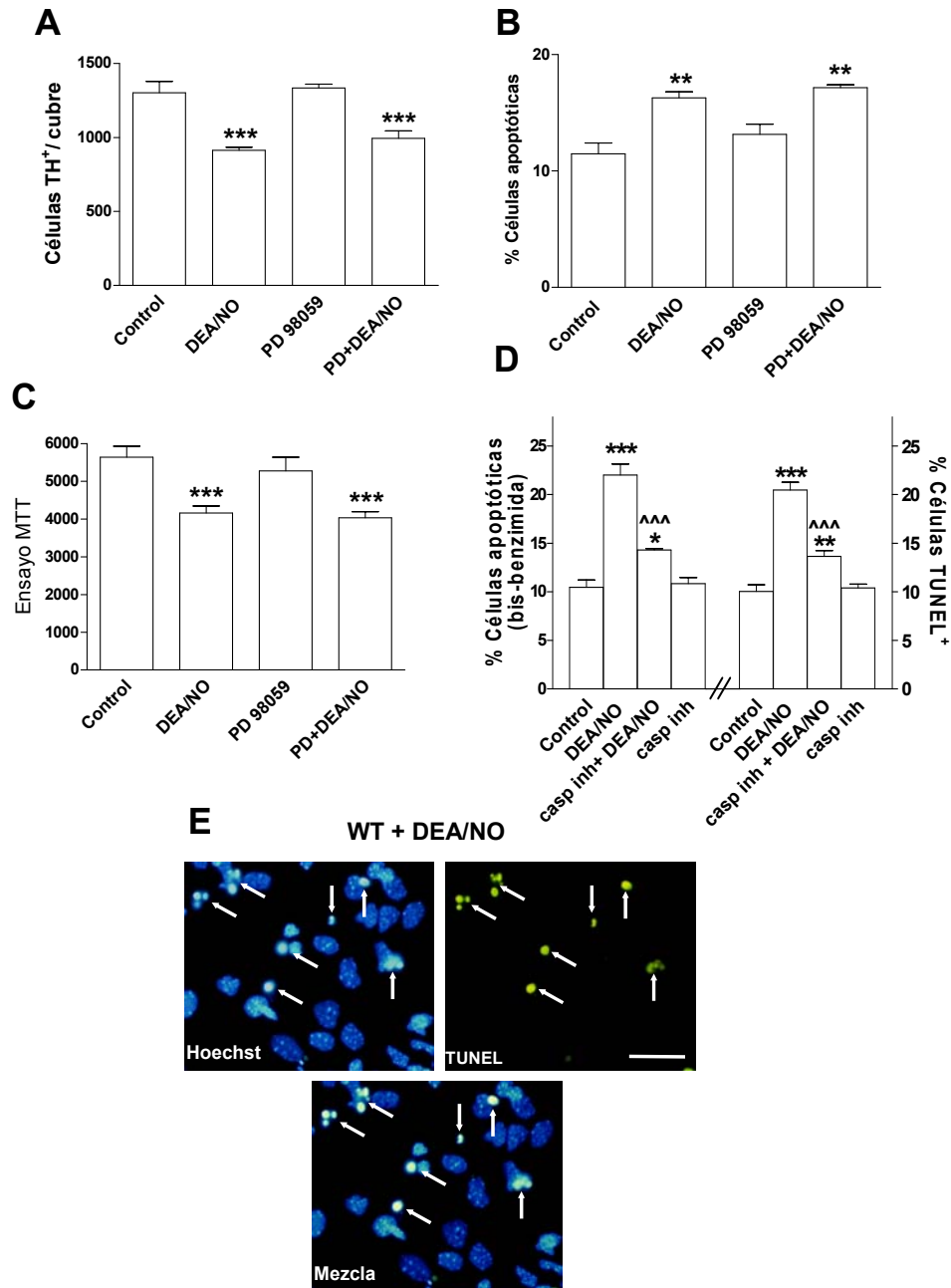


Figura 17. Rutas implicadas en la muerte de los cultivos WT inducida por DEA/NO. Después de 7 DIV, las células se trataron con DEA/NO 400 μ M durante 24 h., 30 minutos antes del tratamiento añadimos los inhibidores de MEK-1/2, PD 98059 (20 μ M), o el inhibidor de caspasas Boc-D-FMK (30 μ M). A) Número de neuronas DAérgicas expresadas como células TH⁺/ cubre. B) Porcentaje de células apoptóticas en el cultivo WT. C) Actividad mitocondrial. D) Porcentaje de las células apoptóticas teñidas con bis-benzimida y con la técnica de TUNEL correspondientes a los mismos campos. E) Imágenes del comarcage de los núcleos apoptóticos al usar la tinción con bis- benzimida y la técnica de TUNEL. Escala = 30 μ m. Los valores se expresan como la media \pm SEM de 6 replicados de tres experimentos diferentes. Para el análisis estadístico usamos un ANOVA de una vía seguido de un test de Newman- Keuls. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ cultivos tratados con DEA/NO vs control. ^^^ $p < 0.001$ cultivos tratados con el inhibidor de caspasas + DEA/NO vs cultivos tratados con DEA/NO.

Además, en trabajos previos hemos descrito que los antioxidantes tiólicos (a los que pertenece el GSH) protegen de la toxicidad inducida por el DEA/NO (Canals et al., 2001b; Rodríguez-Martín et al., 2002) de modo que el NO interacciona con los grupos tiólicos del GSH formando el compuesto S-Nitrosoglutathione (GSNO). Para confirmar esta hipótesis en nuestro modelo hicimos la determinación de GSNO intracelular. De este modo, vimos que después del tratamiento de los cultivos WT y PK-KO con el DEA/NO, los cultivos PK-KO tienen unos niveles de GSNO mucho más altos (200 %) que los que detectamos en los WT (Fig. 18 B), lo que confirma la existencia de una mayor protección en los cultivos PK-KO frente al estrés oxidativo inducido por el DEA/NO y dependiente de la concentración de GSH.

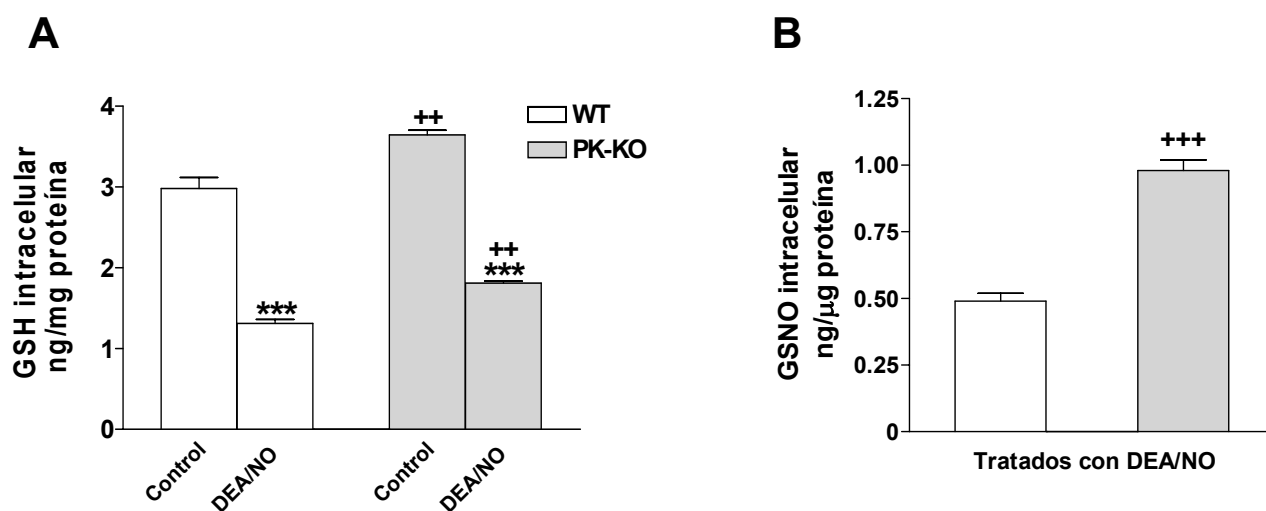


Figura 18. Niveles intracelulares de GSH y GSNO en cultivos WT y PK-KO. Después de 7 DIV, las células se trataron con DEA/NO 400 μ M durante 24 h. A) Niveles intracelulares de GSH expresados como ng/mg proteína. B) La producción de GSNO en cultivos tratados con DEA/NO se determinaron mediante la valoración de los niveles intracelulares de GSH después de incubar los cultivos con o sin CuSO_4 (100 μ M), un compuesto que rompe los enlaces tiólicos. Los valores se expresan como la media \pm SEM de 6 replicados de tres experimentos diferentes. Para el análisis estadístico usamos un ANOVA de una vía seguido de un test de Newman-Keuls. *** $p < 0.001$ cultivos tratados con DEA/NO vs control. ++ $p < 0.01$; +++ $p < 0.001$ cultivos PK-KO vs WT.

3.5 La inhibición de la síntesis de GSH suprime los efectos diferenciales del DEA/NO.

Para saber si el GSH está jugando un papel crucial en la protección de los cultivos PK-KO frente a la toxicidad inducida por el DEA/NO, procedemos a inhibir la síntesis de GSH. La inhibición de la síntesis de GSH con BSO (20 μ M x 48h.), que, en presencia de DEA/NO, disminuye significativamente la concentración de GSH (Fig. 19 A), en los cultivos primarios mesencefálicos WT y PK-KO, suprime los efectos diferenciales que ejercía el NO, tanto al valorar el número de neuronas DAérgicas (Fig. 19 B), como al cuantificar la apoptosis que se produce en los cultivos (Fig. 19 C).

Al estudiar los efectos de la inhibición de la síntesis de GSH en las células gliales, el pretratamiento con BSO produce un aumento de las células de microglía en los cultivos PK-KO respecto a los WT (Fig. 20 A) y la resistencia de los astrocitos de los cultivos PK-KO a la muerte inducida por el DEA/NO también desaparece (Fig. 20 B).

En condiciones de depleción moderada de GSH con un pretratamiento con BSO a concentraciones de 2 μ M durante 4 horas (Fig. 21) o al quelar el GSH con dietilmaleato (DEM) a una concentración de 200 ng/ pocillo durante 2 horas (Chen 2005) (Fig. 22), la resistencia de los cultivos PK-KO a la toxicidad inducida por el DEA/NO desaparece.

Para conseguir una depleción de GSH moderada con el DEM (Fig. 22 A), usamos una concentración de 300 ng de DEM/ pocillo para realizar los experimentos de viabilidad celular (Fig. 22 B, D), así como para estudiar los efectos del co- tratamiento de DEM + DEA/NO sobre la supervivencia de las neuronas DAérgicas (Fig. 22 E) y la liberación de NO (Fig. 22 C). Esta depleción moderada de GSH, con el DEM o con BSO, suprime la resistencia de los cultivos PK-KO como vemos al medir la viabilidad celular (Fig. 21 B, 22 B), la apoptosis (Fig. 21 D, 22 D) y al valorar el número de células TH⁺ (Fig. 21 E, 22 E), lo que nos confirma que los niveles de GSH son vitales para la resistencia a la toxicidad inducida por el NO y que, incluso una disminución moderada de los niveles de GSH, bloquea la resistencia de los cultivos PK-KO al efecto neurotóxico del NO.

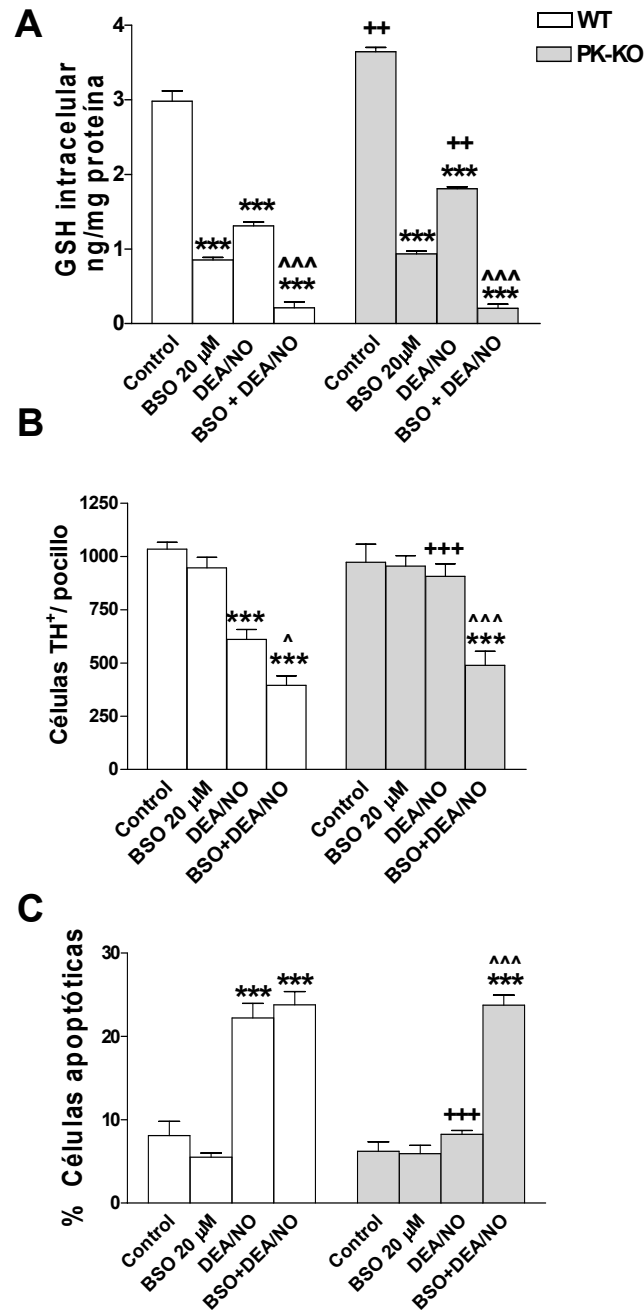


Figura 19. La inhibición de la síntesis de GSH bloquea la respuesta diferencial al tratamiento con DEA/NO en los cultivos WT y PK-KO. Después de 6 DIV, las células se trataron con BSO (inhibidor de la síntesis de GSH) 20 μM durante 24 h.; al día siguiente se trataron con DEA/NO 400 μM durante 24 h. A) Niveles intracelulares de GSH. B) Número de neuronas DAérgicas (células TH⁺). C) Porcentaje de células apoptóticas. Los valores se expresan como la media ± SEM de 6 replicados de 3 experimentos diferentes. Para el análisis estadístico usamos un ANOVA de dos vías (la interacción entre genotipo y tratamiento fue $p < 0.001$) seguido de un test de Bonferroni. *** $p < 0.001$ cultivos tratados con DEA/NO vs control. ++ $p < 0.001$; +++ $p < 0.001$ cultivos PK-KO vs WT. ^ $p < 0.05$; ^^^ $p < 0.001$ cultivos tratados con el BSO + DEA/NO vs cultivos tratados con DEA/NO.

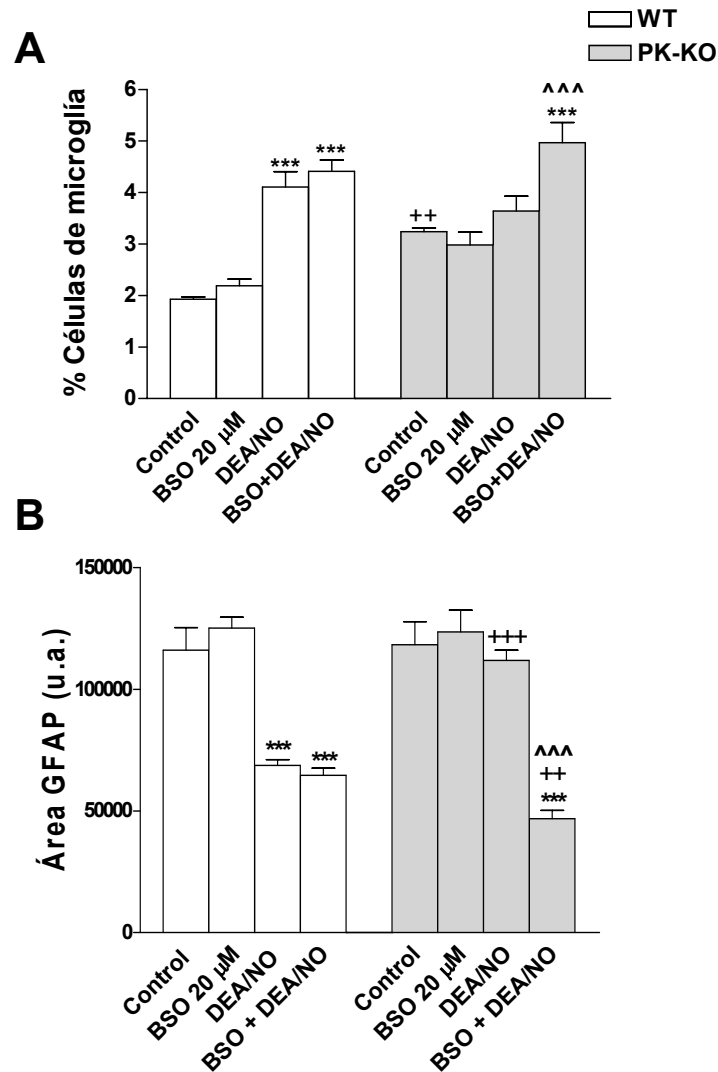


Figura 20. La inhibición de la síntesis de GSH bloquea también la respuesta diferencial inducida por el tratamiento con DEA/NO sobre las células gliales. Después de 6 DIV, las células se trataron con BSO (inhibidor de la síntesis de GSH) 20 μ M durante 24 h.; al día siguiente se trataron con DEA/NO 400 μ M durante 24 h. A) Porcentaje de células de microglía. B) Área GFAP. Los valores se expresan como la media \pm SEM de 6 replicados de tres experimentos diferentes. Para el análisis estadístico usamos un ANOVA de dos vías (la interacción entre genotipo y tratamiento fue $p < 0.001$) seguido de un test de Bonferroni. *** $p < 0.001$ cultivos tratados con DEA/NO vs control. ++ $p < 0.001$; +++ $p < 0.001$ cultivos PK-KO vs WT. ^^ $p < 0.001$ cultivos tratados con el BSO + DEA/NO vs cultivos tratados con DEA/NO.

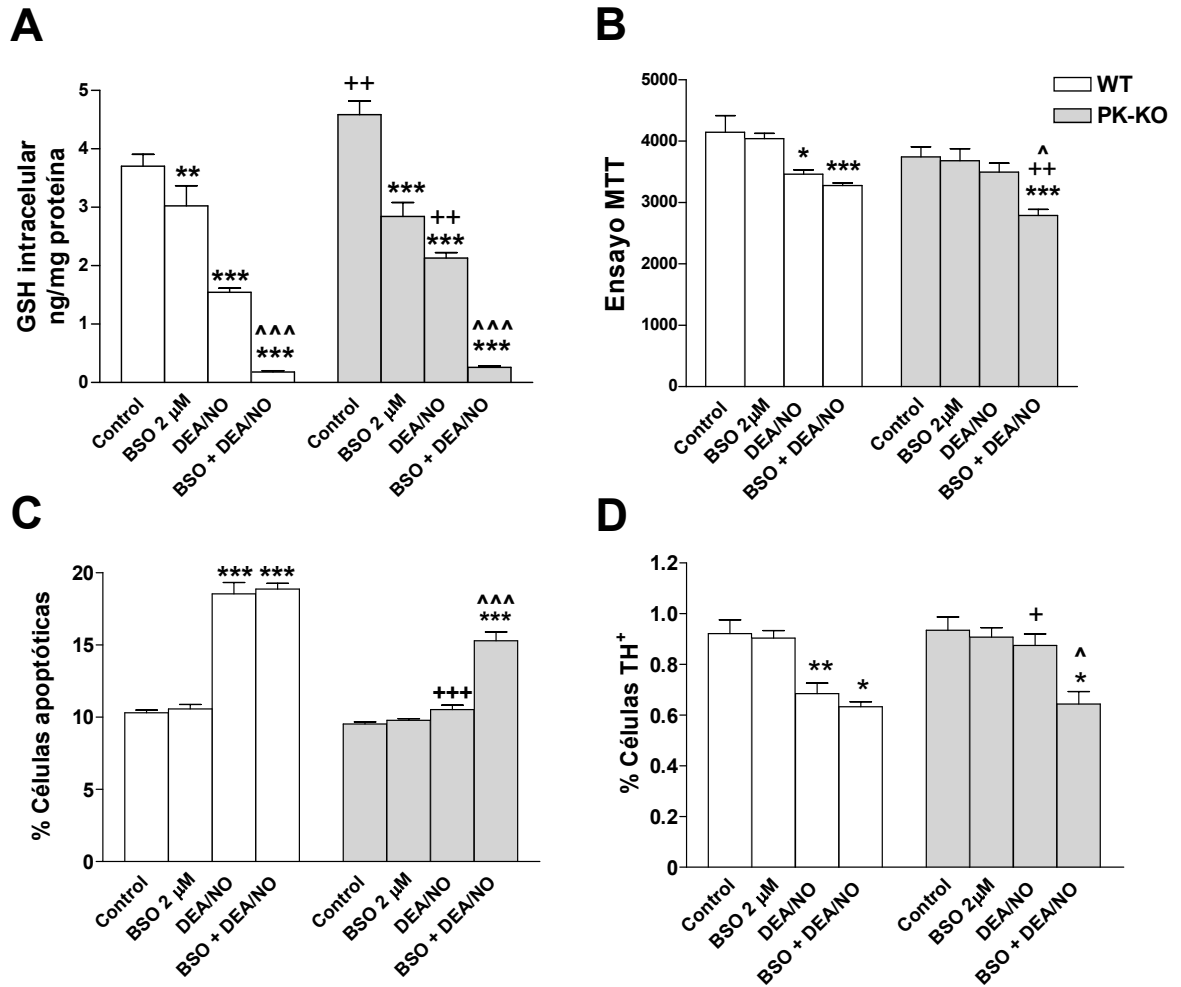


Figura 21. La depleción moderada de GSH también suprime los efectos diferenciales inducidos por DEA/NO en los cultivos WT y PK-KO. Después de 6 DIV, las células se pre-trataron con BSO 2 μ M durante 4 h.; al día siguiente se trataron con DEA/NO 400 μ M durante 20 h. A) Niveles intracelulares de GSH. B) Ensayo de MTT. C) Porcentaje de células apoptóticas. D) Porcentaje de neuronas DAérgicas. Los valores se expresan como la media \pm SEM de 6 replicados de tres experimentos diferentes. Para el análisis estadístico usamos un ANOVA de dos vías (la interacción entre genotipo y tratamiento fue $p < 0.001$) seguido de un test de Bonferroni. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ cultivos tratados con DEA/NO vs control. + $p < 0.05$; ++ $p < 0.01$; +++ $p < 0.001$ cultivos PK-KO vs WT. ^ $p < 0.05$; ^^ $p < 0.001$ cultivos tratados con el inhibidor de GSH + DEA/NO vs cultivos tratados con DEA/NO.

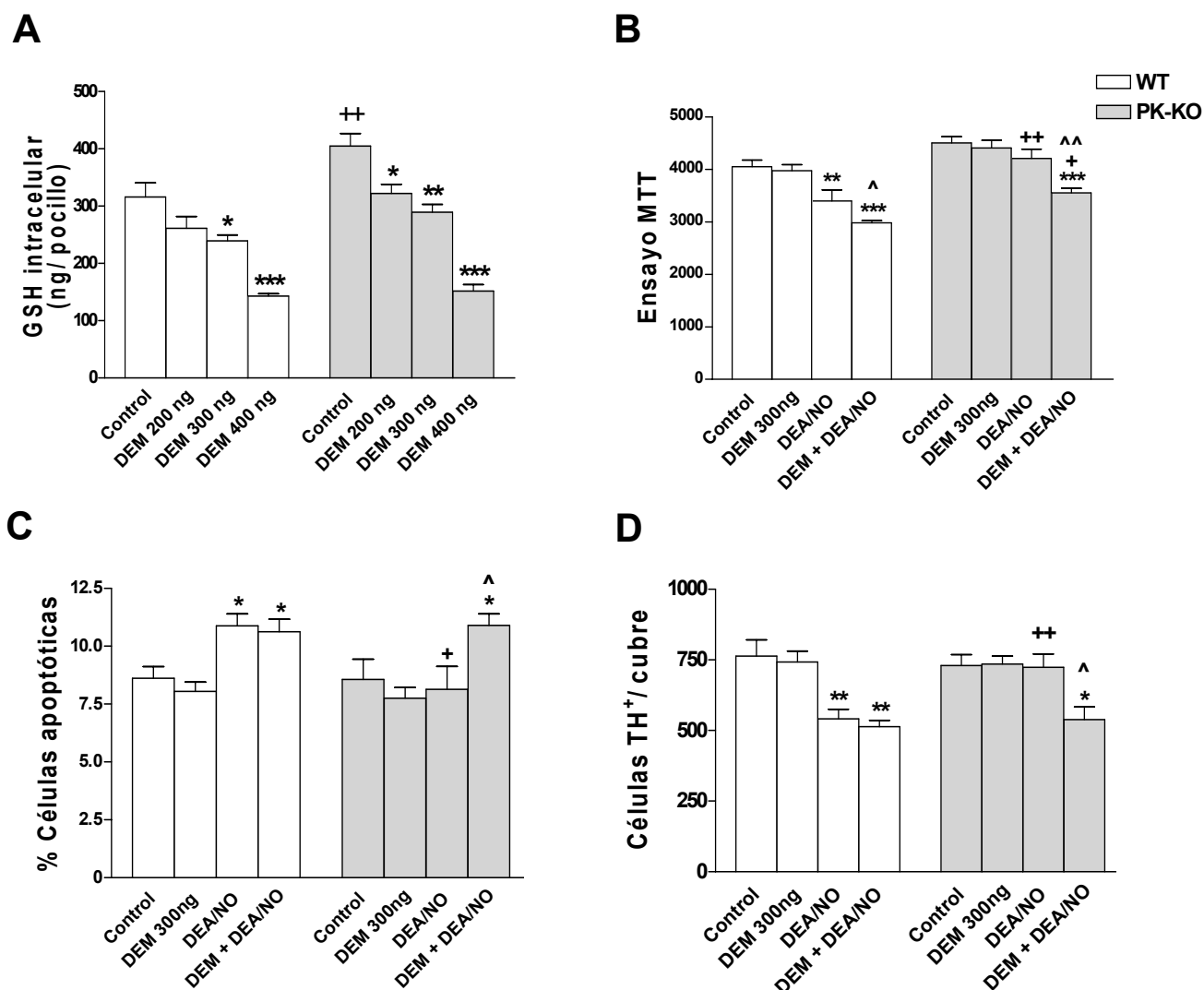


Figura 22. El dietil maleato (DEM) suprime los efectos diferenciales inducidos por el tratamiento con DEA/NO en cultivos WT y PK-KO. Después de 6 DIV, las células se pre-trataron con DEM (quelante de GSH) 200- 400 ng/ pocillo durante 2 h. antes de tratar con DEA/NO 400 μ M durante 20 h. más. A) Niveles intracelulares de GSH. B) Ensayo de actividad mitocondrial. C) Porcentaje de células apoptóticas. D) Número de neuronas DAérgicas. Los valores se expresan como la media \pm SEM de 6 replicados de tres experimentos diferentes. Para el análisis estadístico usamos un ANOVA de dos vías (la interacción entre genotipo y tratamiento fue $p < 0.001$) seguido de un test de Bonferroni. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ cultivos tratados con DEA/NO vs control. + $p < 0.05$; ++ $p < 0.01$ cultivos PK-KO vs WT. ^ $p < 0.05$; ^^ $p < 0.01$ cultivos tratados con DEM + DEA/NO vs cultivos tratados con DEA/NO.

4. EFECTOS DE LA ROTENONA, UN INHIBIDOR DE LA CADENA RESPIRATORIA MITOCONDRIAL, EN CULTIVOS NEURONALES MESENFÁLICOS PRIMARIOS PROCEDENTES DE RATONES WT Y PK-KO.

4.1 Efectos de la rotenona sobre la supervivencia de las neuronas DAérgicas y la muerte celular en los cultivos mesencefálicos.

Muchos autores han señalado la relación entre el desarrollo de la EP y la exposición a agentes químicos usados en la industria agraria (Barbeau et al., 1987; Rajput and Uitti, 1987; Semchuk et al., 1992; Liou et al., 1997). Además, estudios experimentales realizados con pesticidas o agentes químicos relacionados indican que estos compuestos son un factor de riesgo para el desarrollo de la EP (Betarbet et al., 2000; Alam and Schmidt, 2002). Entre estos agentes, los más estudiados han sido el paraquat, rotenona...

Al hacer un tratamiento sobre los cultivos mesencefálicos primarios vemos que la rotenona, un compuesto que inhibe el complejo I de la cadena respiratoria mitocondrial, tiene un efecto dosis- y tiempo-dependiente sobre los cultivos mesencefálicos primarios de ratones WT y PK-KO (Fig. 23). Haciendo un ensayo inmunocitoquímico para ver el efecto de la rotenona sobre las neuronas DAérgicas, usando un anticuerpo anti- TH, vemos que el tratamiento con rotenona a unas determinadas dosis (0.025, 0.05 y 0.1 μ M), produce una disminución de las neuronas TH⁺ de los cultivos PK-KO mayor que la que observamos en los cultivos WT (Fig. 23 A, B) y que, con un tiempo de tratamiento predeterminado (5 horas), los cultivos PK-KO se ven afectadas a dosis más bajas que los cultivos WT (Fig. 23 A, B). Así, los cultivos PK-KO al ser tratados con rotenona 0.025 μ M sufren una reducción en la supervivencia de las neuronas TH⁺ de un 10 %, con rotenona 0.05 μ M de un 40 % y con rotenona 0.1 μ M de un 67 %. En los cultivos WT, sin embargo, no vemos una reducción significativa del número de neuronas DAérgicas con ninguna de las dosis usadas (Fig. 23 A, B).

La muerte por apoptosis sigue el mismo patrón. Al valorar los núcleos identificados como apoptóticos en una preparación inmunocitoquímica teñida con bis- benzimida, vemos que en los cultivos WT, a las 5 horas de tratamiento, hay un incremento significativo (296 %) en el número de células apoptóticas con las dosis de rotenona más altas (0.1 μ M), pero en los cultivos PK-KO vemos que están afectados desde las dosis más bajas (0.025 μ M) (Fig. 23 C).

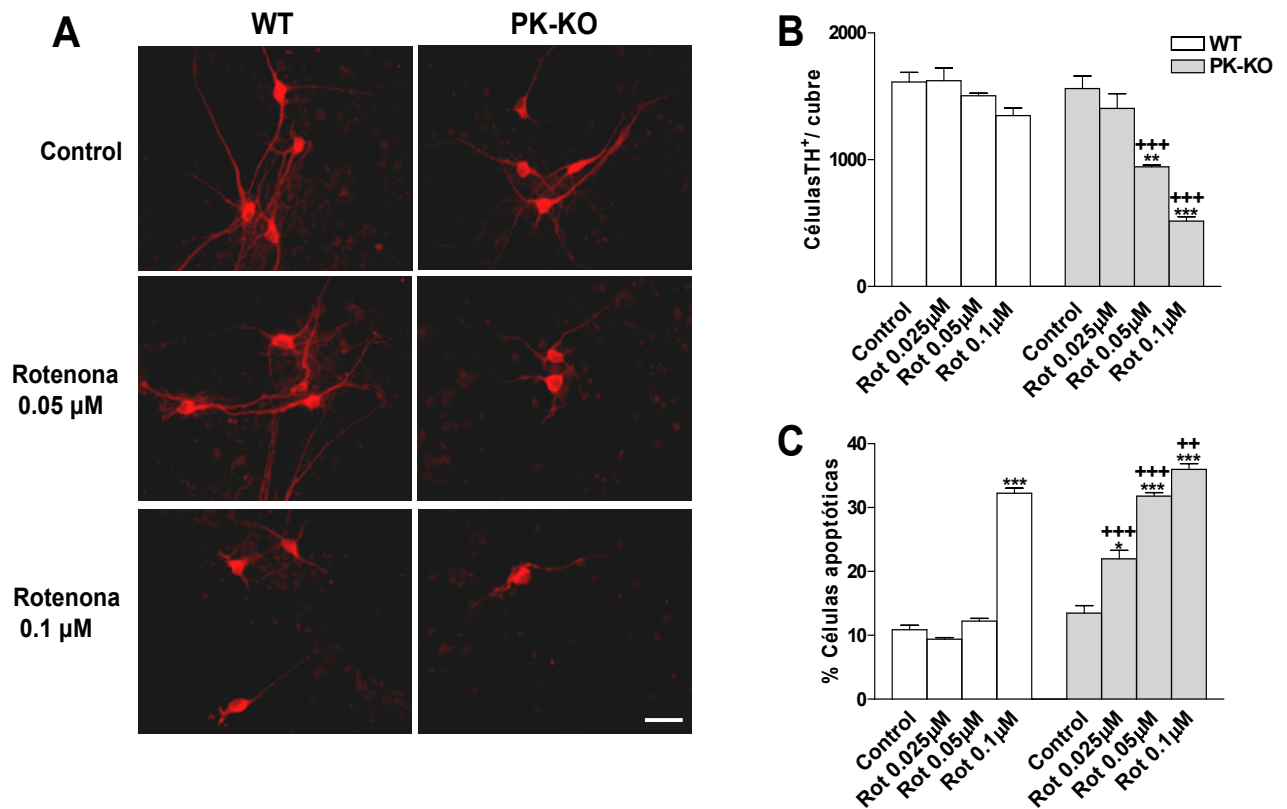


Figura 23. Efectos de la rotenona sobre las neuronas DAérgicas y la muerte celular de los cultivos mesencefálicos WT y PK-KO. Después de 8 DIV, las células se trataron con rotenona a diferentes concentraciones (0.025 μ M, 0.05 μ M y 0.1 μ M) durante 5 h. A) Imágenes de las células DAérgicas (células TH⁺) en cultivos control y tratados con rotenona de WT (izquierda) y PK-KO (derecha). Escala = 30 μ m. B) Número de células DAérgicas valoradas como células TH⁺/cubre. C) Porcentaje de células apoptóticas en el cultivo. Los valores se expresan como la media \pm SEM de 6 replicados de tres experimentos diferentes. Para el análisis estadístico usamos un ANOVA de dos vías (la interacción entre genotipo y tratamiento fue $p < 0.05$) seguido de un test de Bonferroni. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ cultivos tratados con DEA/NO vs control. ++ $p < 0.01$; +++ $p < 0.001$ cultivos PK-KO vs WT.

4.2 Patrón del fenotipo celular afectado por la rotenona en los cultivos mesencefálicos.

La rotenona, usada a una dosis de 0.05 μ M, produce muerte neuronal y disfunción glial en los cultivos PK-KO pero no en los WT. Al hacer un ensayo inmunocitoquímico para observar el efecto que tiene el tratamiento con rotenona sobre las poblaciones celulares presentes en el cultivo vemos que usando dosis de rotenona 0.05 μ M, se reduce significativamente la población neuronal (células MAP-2⁺) en los cultivos PK-KO, mientras que en los WT sufre una reducción pero no es significativa (Fig. 24 A). El tratamiento con rotenona produce muerte neuronal principalmente por apoptosis, lo que demostramos al hacer un comaraje inmunocitoquímico en un cultivo PK-KO tratado con rotenona y valorando los núcleos NeuN⁺ que comarcan con núcleos apoptóticos marcados por la tinción con Hoechst (Fig. 24 B).

La apoptosis que observamos en los cultivos PK-KO es de dos tipos: una apoptosis temprana, caracterizada porque los núcleos son redondos con condensación periférica de cromatina y sin fragmentación de ADN (son negativos al hacer la técnica de TUNEL), y una apoptosis clásica, con los núcleos con la cromatina condensada y fragmentada (positivos para la técnica de TUNEL) (Fig. 24 D). Con un tratamiento con rotenona durante 5 horas y a una concentración de 0.05 μ M, observamos una apoptosis caracterizada porque las células son TUNEL⁻. Tanto la apoptosis más tardía como la necrosis se detectan con tratamientos más prolongados de 24 horas de duración (Fig. 24 C, D, F, G).

Si observamos lo que sucede con la población de células gliales, vemos que el tratamiento con rotenona afecta tanto a las células de microglía como de astrogía. En el caso de las células de microglía, haciendo un ensayo inmunocitoquímico en los que revelamos la microglía usando un anticuerpo anti- isolectina B4, vemos que la rotenona induce un incremento dosis- dependiente de la microglía presente en los cultivos (Fig. 25 A, B). Este aumento lo observamos en los PK-KO desde las dosis usadas más bajas (0.05 μ M), en las que ya vemos un incremento del 60 % respecto al control, mientras que en los cultivos WT se produce sólo un aumento del número de células de microglía a las dosis más altas usadas (incremento del 50 % versus control), en las que, en los cultivos PK-KO, observamos una proliferación de células de microglía (Fig. 25 A, B).

Por otro lado, al estudiar el efecto de la rotenona (0.05 μ M) sobre la astrogía haciendo una inmunocitoquímica en la que usamos un anticuerpo anti-GFAP, vemos que la rotenona aumenta significativamente el número de astrocitos en los cultivos PK-KO mientras que no induce variación sobre la astrogía presente en los cultivos WT (Fig. 25 C, D).

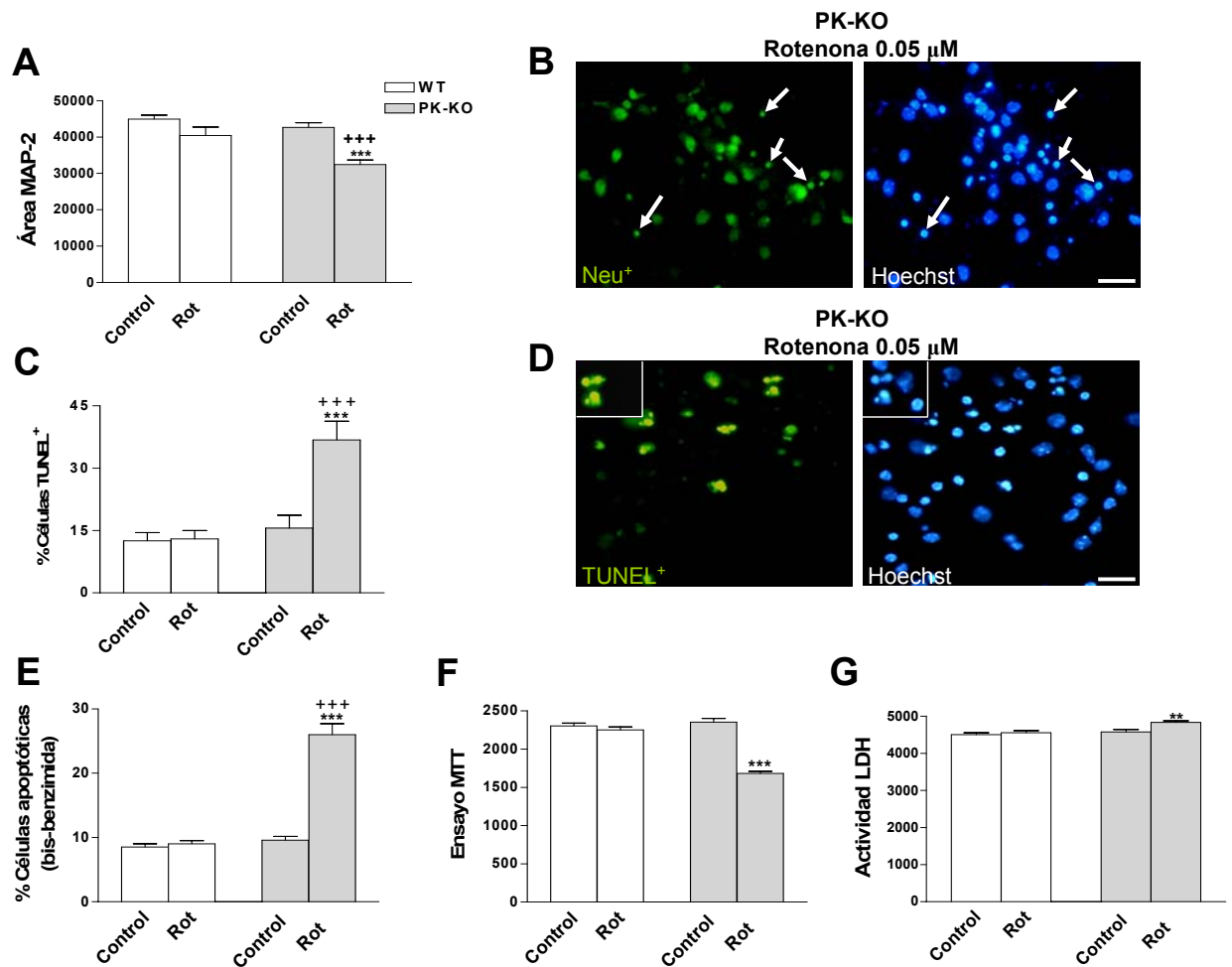


Figura 24. La rotenona induce apoptosis y necrosis en los cultivos PK-KO pero no en los WT. Después de 7 DIV, las células se trataron con rotenona 0.05 μ M durante 24 h. A) Efecto de la rotenona sobre las neuronas del cultivo (Células MAP-2⁺). B) Imágenes de la colocalización de las neuronas (NeuN⁺) y los núcleos apoptóticos en cultivos PK-KO tratados con rotenona. Escala = 30 μ m. C) Porcentaje de células TUNEL⁺. D) Imágenes de los núcleos apoptóticos con las técnicas de TUNEL y tinción con bis-benzimida en cultivos PK-KO tratados con rotenona. El inserto nos muestra que los núcleos apoptóticos con cromatina condensada periféricamente no se marcan con la técnica de TUNEL. Escala = 30 μ m. E) Porcentaje de células apoptóticas, F) Ensayo de actividad mitocondrial, G) Actividad LDH. Los valores se expresan como la media \pm SEM de 6 replicados de tres experimentos diferentes. Para el análisis estadístico usamos un ANOVA de una vía seguido de un test de Newman-Keuls. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ cultivos tratados con rotenona vs control; +++ $p < 0.001$ cultivos PK-KO vs WT.

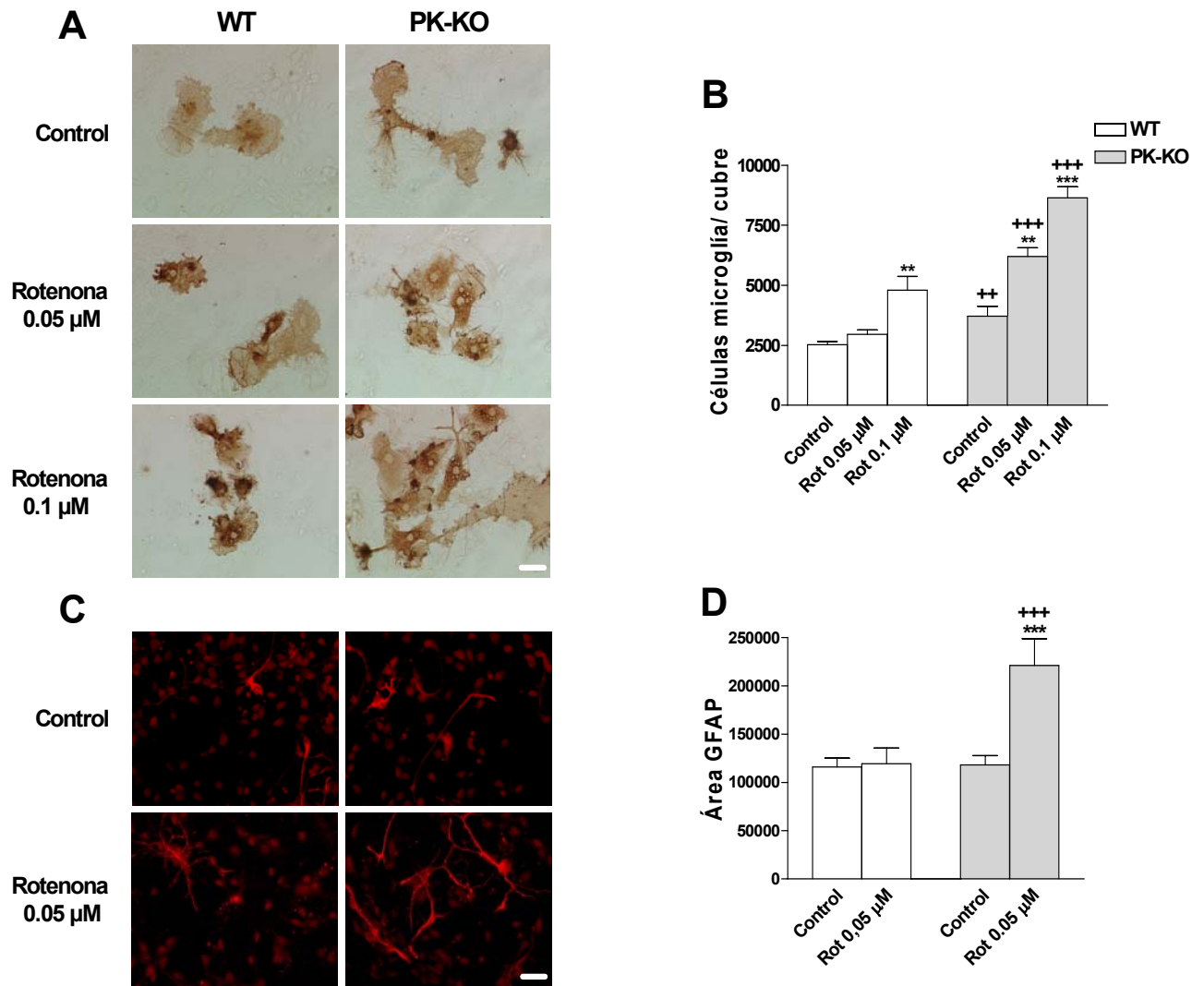


Figura 25. Efectos de la rotenona sobre la población de las células gliales de los cultivos WT y PK-KO. Después de 7 DIV, las células se trataron con rotenona (0.05 μ M and 0.1 μ M) durante 5 h). A) Imágenes de células de microglía (células teñidas con isolectina B4⁺). Escala = 30 μ m. B) Número de células de microglía presentes en el cultivo. C) Imágenes de los astrocitos (GFAP⁺). Escala = 30 μ m. D) Área de astrocitos en los cultivos. Los valores se expresan como la media \pm SEM de 6 replicados de tres experimentos diferentes. Para el análisis estadístico usamos un ANOVA de dos vías (la interacción entre genotipo y tratamiento fue $p < 0.01$) seguido de un test de Bonferroni. ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ cultivos tratados con rotenona vs control. ++ $p < 0.01$; +++ $p < 0.001$ cultivos PK-KO vs WT.

4.3 Estudio de las posibles rutas implicadas en los efectos tóxicos inducidos por la rotenona.

4.3.1 La activación de las vías de la ciclooxigenasa (COX) y de la óxido nítrico sintasa (NOS) no están involucradas en los efectos tóxicos inducidos por la rotenona.

Las células de la microglía y de la astrogliá liberan una variedad de productos citotóxicos como citoquinas, ROS y óxido nítrico, los cuales pueden ser tóxicos para las neuronas DAérgicas (Przedborski et al., 1996; Hirsch et al., 1999; Wu et al., 2002).

Entre los compuestos liberados por la glía destaca el NO, cuyo papel deletéreo en la EP es sustentado por múltiples evidencias en modelos experimentales así como por datos obtenidos de estudios postmortem (Przedborski et al., 1996; Rodríguez-Martín et al., 2000; Canals et al., 2001b; Canals et al., 2001a; Rodríguez-Martín et al., 2002; Wu et al., 2002; Canals et al., 2003a; Canals et al., 2003b). Como hemos descrito previamente, el NO ejerce efectos neurotóxicos cuando existe una excesiva producción, reaccionando con radicales superóxido y formando el anión peroxinitrito que actúa como potente agente oxidante; inhibe la cadena respiratoria mitocondrial y rompe la homeostasis celular. Tanto el estrés oxidativo como la inhibición de la cadena respiratoria mitocondrial se observa en la *substantia nigra* de pacientes con EP (Konradi et al., 1989; Mizuno et al., 1989; Schapira et al., 1990). *In vitro*, la enzima óxido nítrico sintasa inducible (NOSi) se expresa en astrocitos y en células de microglía (Simmons and Murphy, 1994). En la EP la densidad de células gliales productoras de NO está significativamente incrementada (Hunot et al., 1996; Good et al., 1998). Dada la amplia descripción del efecto deletéreo del NO sobre las neuronas, es posible especular que la inducción de NOS en células de la glía de la *substantia nigra* en pacientes con EP pueda participar en la muerte neuronal.

Para estudiar ambas vías usamos inhibidores de las mismas: N-nitro-L-arginina metil ester (L-NAME, 1 mM) que inhibe la NOS e indometacina (5 y 15 μ M) que inhibe la COX. Para inhibir ambas enzimas hacemos un pretratamiento previo (30 min) del cultivo con los inhibidores antes del tratamiento con la rotenona.

Al realizar estudios de viabilidad en los cultivos PK-KO tratados con rotenona 0.05 μ M durante 5 horas, valorando el número de células TH⁺ mediante técnicas inmunocitoquímicas y haciendo ensayos para valorar la actividad de la cadena de transporte mitocondrial (MTT), vemos que ninguno de los dos inhibidores protege de la muerte de las neuronas DAérgicas (Fig 26 A, C). Al valorar el porcentaje de células apoptóticas, vemos que tampoco protegen de la muerte inducida por la rotenona (Fig. 26 B). Además, los inhibidores no protegen de la proliferación de la población astrocitaria (Fig. 26 D) y tampoco previenen el aumento de las células de microglía presentes en el cultivo (Fig. 26 E). En algunos casos, los inhibidores potencian el efecto tóxico de la rotenona.

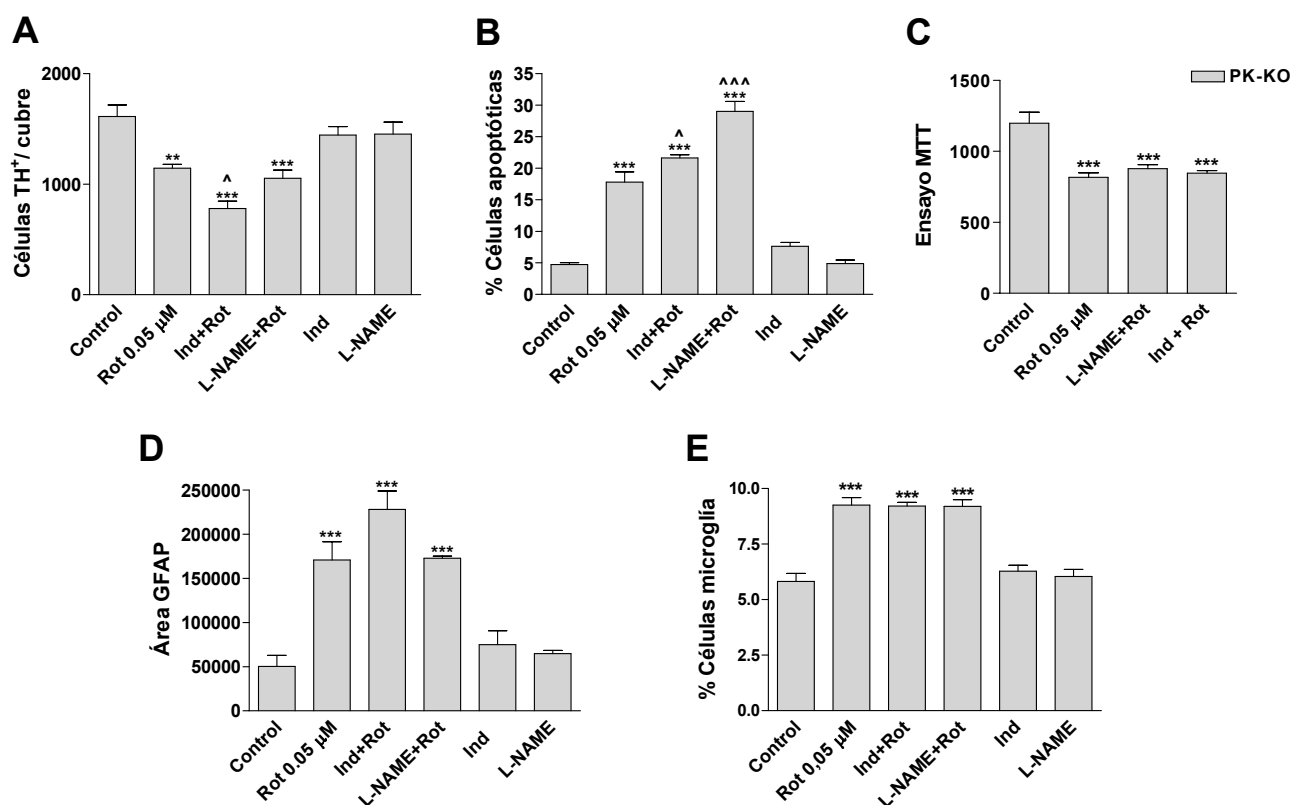


Figura 26. Los inhibidores de las rutas de la COX y de la NOS no protegen de la toxicidad inducida por la rotenona en los cultivos PK-KO. Después de 7 DIV, las células se trataron con rotenona 0.05 μ M durante 5 h; 30 minutos antes del tratamiento añadimos los inhibidores indometacina (15 μ M), o L-NAME (1 mM). A) Efectos sobre las neuronas DAérgicas. B) Porcentaje de células apoptóticas. C) Ensayo de MTT. D) Área de astrocitos en el cultivo. E) Porcentaje de células de microglía. Los valores se expresan como la media \pm SEM de 6 replicados de tres experimentos diferentes. Para el análisis estadístico usamos un ANOVA de una vía seguido de un test de Newman-Keuls. ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ cultivos tratados con rotenona vs control; ^A $p < 0.05$, ^{AAA} $p < 0.001$ cultivos tratados con los inhibidores + rotenona vs cultivos tratados con rotenona.

4.3.2 La inactivación de la Nicotiamida-Adenina Dinucleotido fosfato (NADPH) oxidasa protege a las neuronas DAérgicas de la muerte inducida por la rotenona en los cultivos PK-KO.

Algunos autores han descrito que uno de los principales efectos tóxicos de la rotenona viene dado al promover la liberación del anión superóxido al medio extracelular catalizada por la enzima NADPH oxidasa en la microglía (Gao et al., 2002; Gao et al., 2003b; Zoccarato et al., 2005). Para estudiar el posible papel de esta vía en nuestro modelo procedimos a inhibir esta ruta usando un inhibidor específico de la NADPH oxidasa, la

apocinina (0.5 mM). Vemos que el tratamiento previo con la apocinina (30 min. antes de tratar el cultivo con rotenona), protege completamente a las neuronas DAérgicas de la muerte inducida por la rotenona, tanto al valorar la viabilidad de las neuronas DAérgicas presentes en el cultivo PK-KO, cuantificando el número de células TH⁺ (Fig. 27 A), como al valorar la funcionalidad de las mismas mediante una captación de ³H-DA en el cultivo PK-KO (Fig. 27 B). Vemos que también ejerce un efecto protector sobre la viabilidad general de cultivo PK-KO al hacer un ensayo de MTT (Fig. 27 E). Además, la apocinina previene totalmente la activación de la microglía (Fig. 27 C) y, casi totalmente, la muerte celular apoptótica (Fig. 27 D).

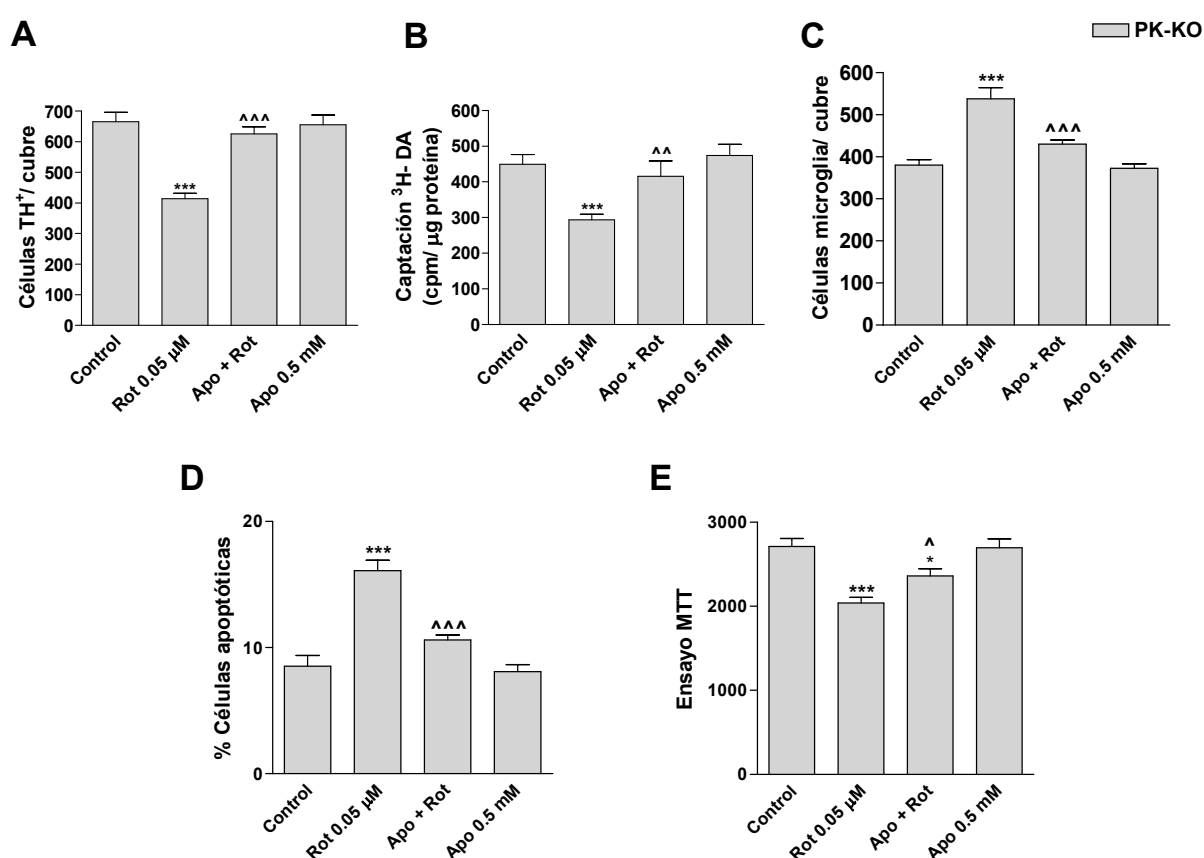


Figura 27. La inactivación de la NADPH oxidasa protege a las neuronas DAérgicas de la muerte inducida por la rotenona en los cultivos PK-KO. Después de 7 DIV, las células se trataron con rotenona 0.05 μM durante 5 h; 30 minutos antes del tratamiento añadimos la apocinina (inhibidor de la NADPH oxidasa), 0.5 mM. A) Efecto sobre las células TH⁺. B) Captación de ³H-DA. C) Número de células de microglía. D) Porcentaje de células apoptóticas. E) Ensayo de MTT. Los valores se expresan como la media ± SEM de 6 replicados de tres experimentos diferentes. Para el análisis estadístico usamos un ANOVA de una vía seguido de un test de Newman-Keuls. * p< 0.05, *** p< 0.001 cultivos tratados con rotenona vs control; ^ p< 0.05, ^^ p< 0.01, ^^^ p< 0.001 cultivos tratados con el inhibidor + rotenona vs cultivos tratados con rotenona.

4.3.3 Estudio de las vías de las MAPK.

En los modelos de neurotoxicidad en los que se produce una activación de la microglía, se ha postulado que juegan un papel importante las vías de la p-38 MAPK y de p-ERK 1/2 MAPK. Para confirmar este supuesto, hacemos un pretratamiento, 30 minutos antes de tratar con rotenona, con inhibidores específicos de la p38 MAPK, SB 20358 (10 y 20 μ M) y de MEK, PD 98059 (5, 15 y 20 μ M). Haciendo estudios de viabilidad (MTT) y de necrosis celular (LDH), vemos que ninguno de los inhibidores protege de la muerte celular inducida por la rotenona (Fig. 28) e incluso el tratamiento con el inhibidor de la p-38 MAPK incrementó la muerte inducida por la rotenona.

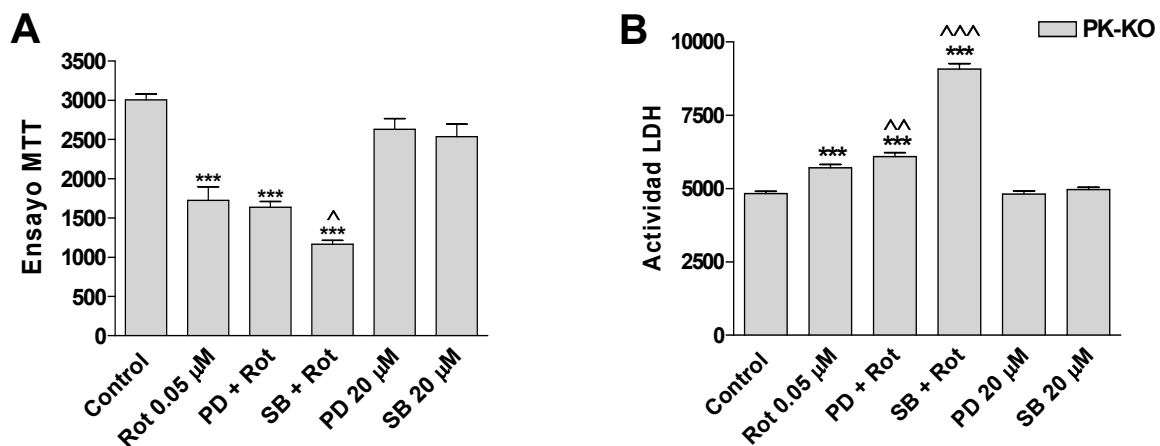


Figura 28. Papel de la vía de las MAPK en la muerte inducida por rotenona en los cultivos PK-KO. Después de 7 DIV, las células se trataron con DEA/NO 400 μ M durante 24 h, 30 minutos antes del tratamiento añadimos los inhibidores de MEK-1/2, PD 98059 (20 μ M), o el inhibidor de la p38 MAPK, SB 20358 (20 μ M). A) Ensayo de actividad mitocondrial. B) Actividad LDH. Los valores se expresan como la media \pm SEM de 6 replicados de tres experimentos diferentes. Para el análisis estadístico usamos un ANOVA de una vía seguido de un test de Newman-Keuls. *** $p < 0.001$ cultivos tratados con rotenona vs control. ^ $p < 0.05$; ^^ $p < 0.01$; ^^ $p < 0.001$ cultivos tratados con los inhibidores + rotenona vs cultivos tratados con rotenona.

4.3.4 Implicación de la vía de las caspasas.

En pacientes parkinsonianos se han detectado signos de daño oxidativo sobre las neuronas DAérgicas lo que sugiere que el estrés oxidativo juega un papel muy importante en la EP (Beal, 2001; Dauer and Przedborski, 2003; Jenner, 2003). En nuestros estudios previos con donadores de óxido nítrico hemos visto la importancia que tiene la ruta de las caspasas en la prevención de los efectos tóxicos inducidos por el NO. Como hemos descrito

previamente, las células de la glía liberan NO por lo que nos pareció interesante estudiar el papel que juega la ruta de las caspasas en este modelo.

Para estudiar la posible implicación de la vía de las caspasas en la muerte inducida por la rotenona sobre los cultivos PK-KO, usamos el inhibidor de amplio espectro de la ruta de las caspasas (Boc-D-FMK 30 μ M) que añadimos al cultivo treinta minutos antes del tratamiento con rotenona. Vemos, mediante estudios inmunocitoquímicos, que la adición del inhibidor protege, parcialmente, de la muerte apoptótica inducida por la rotenona sobre los cultivos PK-KO tanto al valorar las células TUNEL⁺ (Fig. 29 A) como al cuantificar el porcentaje de células apoptóticas marcadas con bis- benzimida (Fig. 29 B). Además, podemos ver la protección que ejerce el inhibidor al hacer un ensayo de MTT (Fig. 29 C). Por otro lado, vemos que el inhibidor no protege de la muerte que se produce por necrosis al hacer un estudio de citotoxicidad en el cultivo PK-KO (Fig. 29 D).

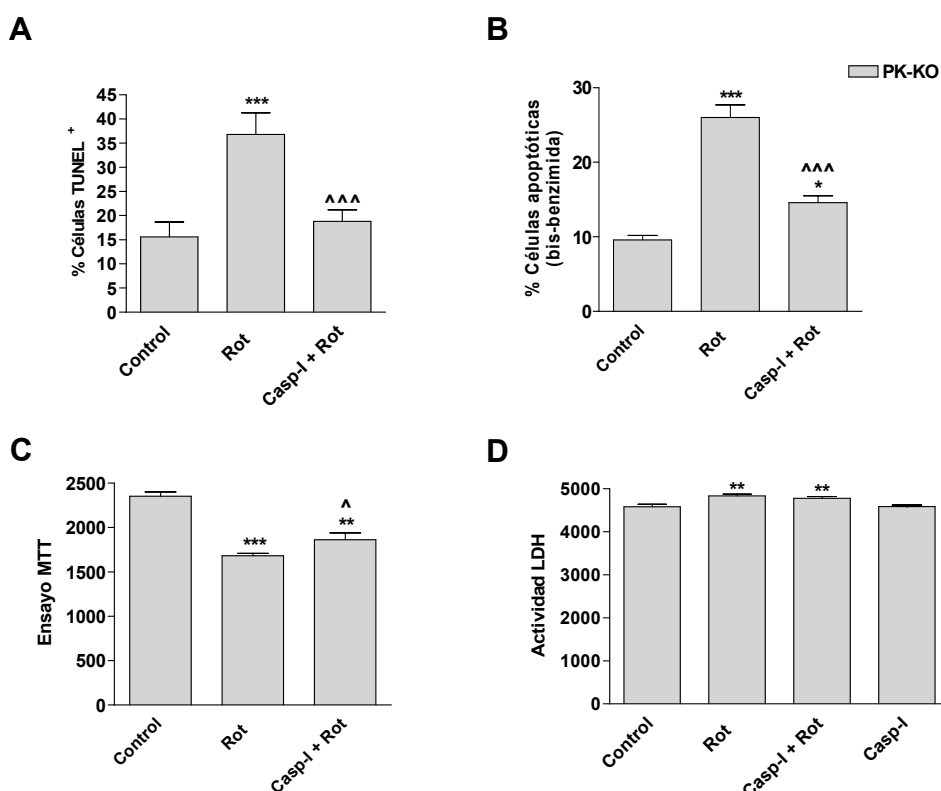


Figura 29. Papel de la vía de las caspasas en la muerte inducida por rotenona en los cultivos PK-KO. Después de 7 DIV, las células se trataron con rotenona 0.05 μ M durante 24 h., 30 minutos antes del tratamiento añadimos el inhibidor de amplio espectro de la vía de las caspasas, Boc-D-FMK (30 μ M). A) Porcentaje de células apoptóticas valoradas con la técnica de TUNEL. B) Porcentaje de células apoptóticas valoradas mediante la tinción con bis-benzimida. C) Ensayo de actividad mitocondrial. D) Actividad lactato deshidrogenasa. Los valores se expresan como la media \pm SEM de 6 replicados de tres experimentos diferentes. Para el análisis estadístico usamos un ANOVA de una vía seguido de un test de Newman-Keuls. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ cultivos tratados con rotenona vs control. ^ $p < 0.05$; ^^^ $p < 0.001$ cultivos tratados con Boc-D-FMK + rotenona vs cultivos tratados con rotenona.

4.4 La inhibición de la activación de la microglía protege de la muerte celular inducida por rotenona.

La neurodegeneración de las células DAérgicas inducida por la rotenona se asocia tanto a la inhibición que produce sobre el complejo I de la cadena respiratoria mitocondrial como a la activación de las células de microglía que parece que lleva asociada. En nuestro modelo hemos visto que el tratamiento con rotenona conlleva un aumento de las células de microglía en el cultivo. Para conocer la importancia de este fenómeno procedimos a inhibir la activación de la microglía.

Para inactivar la microglía se utilizó minociclina 20 μ M (Wu et al., 2002). La minociclina es una tetraciclina que tiene efectos antiinflamatorios y bloquea la activación de la microglía en respuesta a neurotóxicos como el 1-metil-4-fenil-1, 2,3,6 tetrahidropiridina (MPTP), lipopolisacárido (LPS), etc (Yrjanheikki et al., 1999). Al realizar técnicas inmunocitoquímicas para valorar la supervivencia de las neuronas DAérgicas, la apoptosis que se produce en el cultivo y la cantidad de células gliales (microglía y astrogía) vemos que, con la inactivación de la microglía, añadiendo el inhibidor 30 minutos antes de hacer el tratamiento con la rotenona, se previene totalmente la muerte de las neuronas DAérgicas y la apoptosis del cultivo procedente de ratones PK-KO (Fig. 30 A, B, C, D). Además, el inhibidor bloquea el incremento de las células de microglía (Fig. 30 F) pero no previene del incremento de la población astrocitaria (Fig. 30 E).

Vemos que la minociclina parece ser un agente neuroprotector importante en la muerte inducida por dosis bajas de rotenona en los cultivos PK-KO.

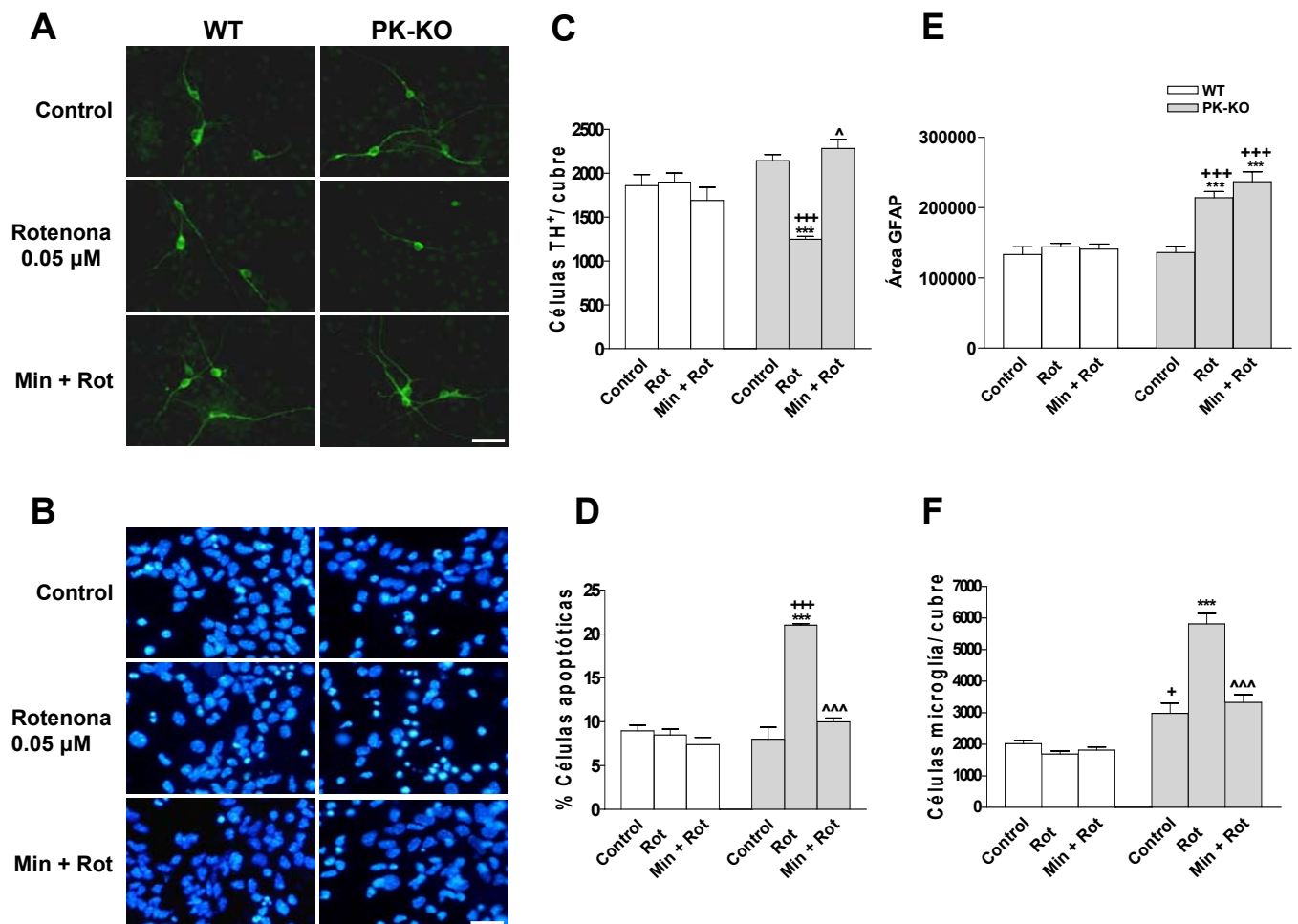


Figura 30. La minociclina previene la muerte celular inducida por dosis bajas de rotenona en cultivos PK-KO. Después de 7 DIV, las células se trataron con rotenona 0.05 μ M durante 5 h; 30 minutos antes del tratamiento añadimos la minociclina (20 μ M). A) Imágenes de las neuronas DAérgicas. B) Imágenes de los núcleos teñidos con bis-benzimida. C) Número de neuronas DAérgicas. D) Porcentaje de las células apoptóticas en el cultivo. E) Área de astrocitos en el cultivo. F) Número de células de microglía. Los valores se expresan como la media \pm SEM de 6 replicados de tres experimentos diferentes. Para el análisis estadístico usamos un ANOVA de dos vías (la interacción entre genotipo y tratamiento fue $p < 0.001$) seguido de un test de Bonferroni. *** $p < 0.001$ cultivos tratados con rotenona vs control; + $p < 0.05$, +++ $p < 0.001$ cultivos PK-KO vs WT. ^ $p < 0.05$, ^^ $p < 0.001$ cultivos tratados con minociclina + rotenona vs cultivos tratados con rotenona.

4.5 La adición de microglía PK-KO a los cultivos neuronales WT incrementa la muerte de las neuronas DAérgicas inducida por dosis bajas de rotenona.

Queremos saber si la microglía PK-KO tiene un papel central en la toxicidad inducida por la rotenona sobre los cultivos PK-KO. Para estudiar el papel de la microglía añadimos una densidad de células de microglía PK-KO determinada sobre un cultivo WT. La adición de microglía PK-KO (1.2×10^4 células) en un cultivo mesencefálico WT hace que la rotenona, a una dosis ($0.05 \mu\text{M}$) que no es tóxica para las neuronas del cultivo WT, aumente significativamente la neurodegeneración de las neuronas DAérgicas (Fig. 31). Hacemos un ensayo inmunocitoquímico usando un anticuerpo anti-TH para identificar las neuronas DAérgicas. Al valorar el número de células TH⁺ con sus prolongaciones vemos que el número de estas neuronas disminuye significativamente respecto al control (Fig. 31 A). Este efecto lo pudimos apreciar también al valorar la actividad de las neuronas DAérgicas haciendo una captación de ³H-DA (Fig. 31 B).

Con estos resultados podemos decir que la microglía PK-KO juega un papel fundamental en la toxicidad de la rotenona sobre los cultivos mesencefálicos enriquecidos en neuronas. Dosis de rotenona que no son tóxicas en cultivos neuronales WT inducen degeneración de las neuronas DAérgicas en presencia de microglía de ratones PK-KO.

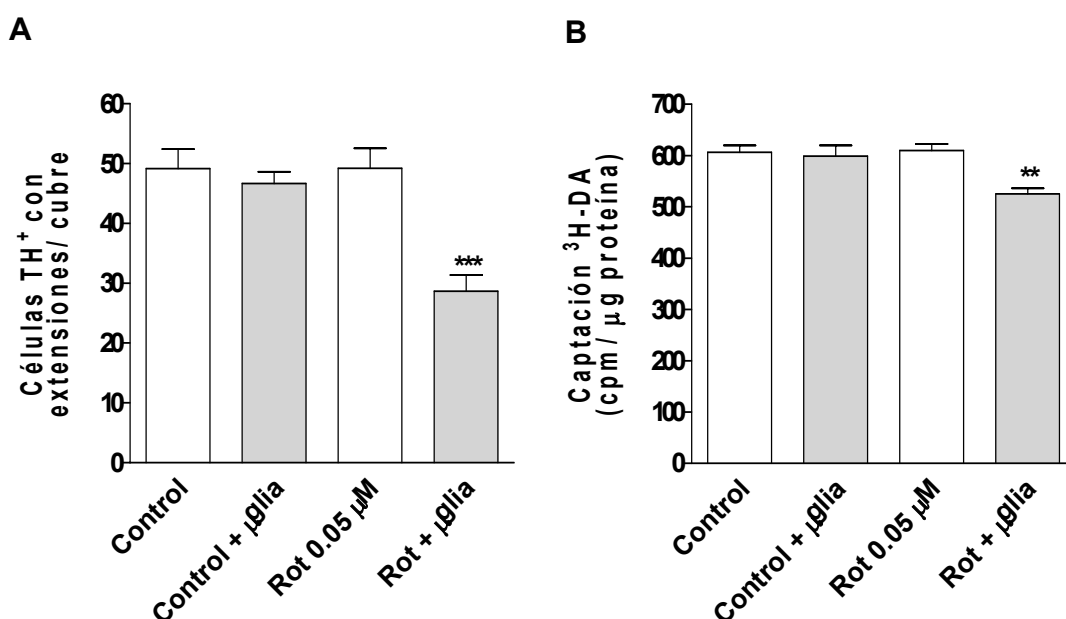


Figura 31. La adición de microglía PK-KO induce la muerte de las neuronas DAérgicas en un cultivo WT al tratarlo con dosis no tóxicas de rotenona. Después de 6 días “in vitro”, a los cultivos WT se les añadieron 1.2×10^4 células de microglía/ pocillo, 24 h después, las células se trataron con rotenona $0.05 \mu\text{M}$ durante 5 h. A) Número de células DAérgicas con prolongaciones. B) Captación de ³H-DA. Los valores se expresan como la media \pm SEM de 6 replicados de tres experimentos diferentes. Para el análisis estadístico usamos un ANOVA de una vía seguido de un test de Newman-Keuls. ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ cultivos tratados con rotenona vs control.

5. MODELO “IN VIVO”: EFECTOS DE LA CINARIZINA, UN ANTAGONISTA DEL CALCIO QUE PRODUCE PARKINSONISMO EN HUMANOS, SOBRE LOS RATONES MUTANTES PARA EL GEN *PARK-2*.

5.1 Efectos de la cinarizina sobre el consumo de agua, comida y peso de los ratones.

El parkinsonismo inducido por drogas tales como antipsicóticos, antagonistas de los canales de calcio, antiarrítmicos, litio, estrógenos, etc., suele ser bastante frecuente (Tarsy, 1989; Jimenez-Jimenez et al., 1997; Van Gerpen, 2002). El parkinsonismo inducido por los antagonistas de calcio sigue siendo un gran problema médico en algunos países en los que se usan normalmente esos compuestos que producen déficit irreversible en más de 1/3 de los pacientes (Garcia-Ruiz et al., 1992b).

La cinarizina es una antagonista de calcio que se usa en los tratamientos de vértigo y dolores de cabeza que produce parkinsonismo persistente después de una administración oral en monos sanos (Garcia-Ruiz et al., 1992a), lo que sugiere que algunos antagonistas de los canales de calcio pueden producir parkinsonismo, dependiente de la dosis usada, en monos sanos. De todos modos, el riesgo de sufrir parkinsonismo como consecuencia del tratamiento con ciertas drogas es mucho mayor en individuos con predisposición genética, debido a la existencia de casos familiares (Garcia-Ruiz et al., 1992b), lo que nos indica que la posesión de factores genéticos de riesgo incrementa el riesgo de padecer Parkinson en ciertos individuos como consecuencia del tratamiento con ciertas drogas.

En nuestro modelo de ratones knock out para el gen *park-2* hemos descrito que tienen el metabolismo de la DA alterado (Itier et al., 2003). Para ver si hay alguna relación entre estas alteraciones en la liberación de la DA observada en estos ratones y el calcio, vamos a estudiar el efecto que produce la cinarizina, un antagonista de calcio, en los ratones PK-KO.

Los ratones PK-KO adultos (14 meses) pesan significativamente menos que los WT (Itier et al., 2003; Palacino et al., 2004), aunque se comportan, comen y ganan peso normalmente. El tratamiento con cinarizina no produce ningún cambio significativo en la ganancia de peso durante el experimento (Fig. 33 A), ni en el consumo de comida ni de bebida. Todos los ratones usados en el experimento tenían un comportamiento normal pero todos los ratones PK-KO tratados con cinarizina desarrollaron áreas de alopecia (Fig. 32) que no se observaron en los ratones de los otros tres grupos experimentales.

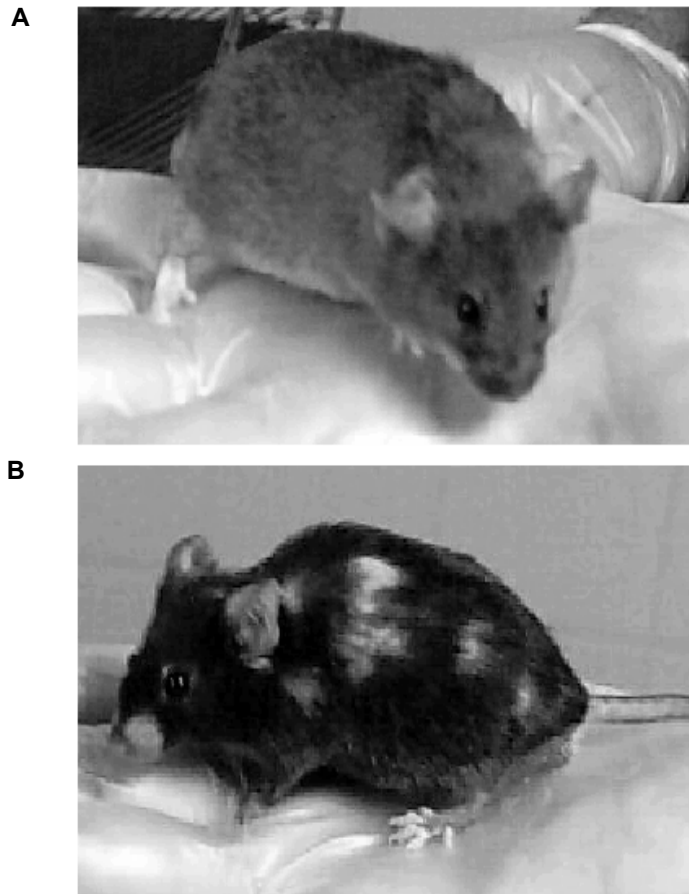


Figura 32. Fotografía de un ratón control WT (A) y un knock-out para el gen *park-2* tratado con cinnarizina (B) en el que se puede ver una alopecia focal.

5.2 Efectos de la cinnarizina sobre el comportamiento.

Al finalizar el experimento, los ratones WT y PK-KO, tanto controles como tratados con cinnarizina, no presentaron ningún cambio significativo en el incremento del peso corporal. Al estudiar la actividad locomotora de los ratones vemos que los ratones PK-KO tratados con cinnarizina sufrieron un descenso considerable de la actividad locomotora respecto a los ratones PK-KO controles (Fig. 33 B) y mucho más importante si los comparamos con los ratones WT tratados con cinnarizina. Estos datos sugieren que, en las condiciones en las que hicimos el experimento, la cinnarizina no tiene un efecto aparente en los ratones WT pero si en los ratones PK-KO, que tienden a reducir su actividad locomotora, lo que se puede considerar como un efecto akinético de la cinnarizina.

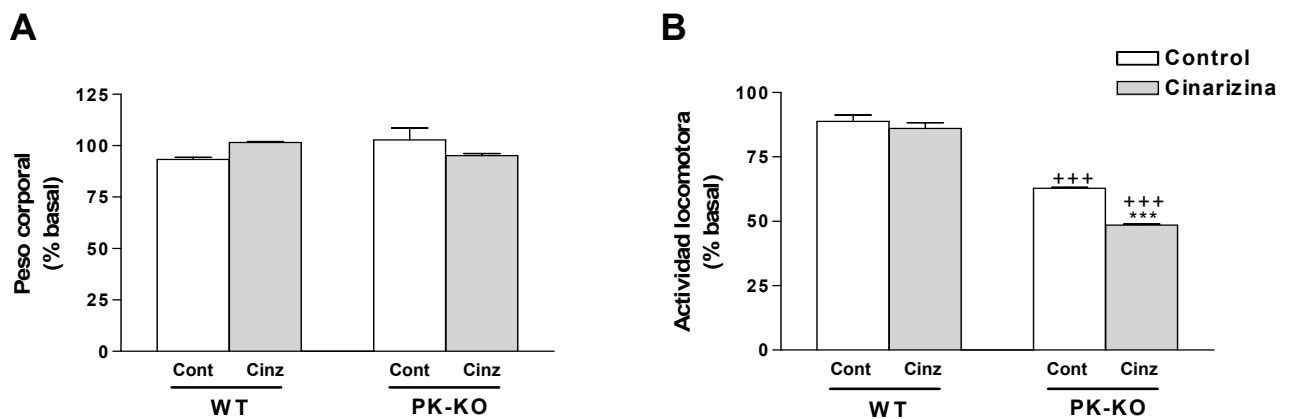


Figura 33. Efecto de la cinarizina sobre el peso corporal y la actividad motora de los ratones WT y PK-KO. Los valores se expresan como la media \pm SEM ($n = 6$ animales por grupo experimental). El análisis estadístico utilizado fue un ANOVA de una vía seguido de un test Newman-Keuls. *** $p < 0.001$ ratones tratados con cinarizina vs sus respectivos controles. +++ $p < 0.001$ PK-KO vs sus respectivos ratones WT.

5.3 Efecto de la cinarizina sobre el metabolismo de las monoaminas.

Los niveles de DA, como ya habíamos descrito (Itier et al., 2003), no están reducidos en ninguna de las áreas del cerebro de los ratones PK-KO; por el contrario, en el estriado tienen unos niveles mayores que los WT aunque no llegan a ser significativos (Tablas 3, 4 y 5). Del mismo modo, los niveles de DOPAC, metabolito de la DA por efecto de la actividad del enzima MAO-B, están incrementados en el estriado y el sistema límbico de los ratones PK-KO y el tratamiento con cinarizina prácticamente revierte ese cambio. El 3- MT está aumentado en los ratones PK-KO, tanto en los controles como en los ratones tratados con cinarizina. Los ratones PK-KO también tienen mayores niveles de ácido homovanílico (HVA). Estos datos confirman, como se describió previamente (Itier et al., 2003), que los ratones PK-KO tienen mayores niveles de DA y sus metabolitos, lo que sugiere alguna anomalía en el sistema de liberación. El tratamiento con cinarizina revierte parte de estos cambios confirmando también que la cinarizina tiene algún efecto de depleción en el sistema DAérgico (Mena et al., 1995).

Por otro lado, en los ratones PK-KO observamos un incremento de NA en todas las áreas cerebrales estudiadas, y el tratamiento con cinarizina acentúa esos cambios. El 5- HT está reducido en los ratones WT tratados con cinarizina y no vemos ningún cambio en los ratones PK-KO. Los niveles de 5- HIAA están aumentados en el sistema límbico de los ratones PK-KO, tanto tratados con cinarizina como en controles; también hay un aumento

de este metabolito, aunque menos pronunciado, en el resto de áreas cerebrales. Así, el tratamiento con cinarizina, junto con la supresión de la proteína parkina, hace que se aumenten los niveles de NA y el turnover de 5- HT.

SISTEMA LÍMBICO

	WT Control	WT cinarizina	PK-KO Control	PK-KO cinarizina
DA	1365±114 100%	1424±96 104%	1579±92 116%	1892±165 Δ 139%
DOPAC	171.24±13 100%	188±8.3 109%	237±12.8 ⁺⁺ 138%	188.7±16* 110%
HVA	169±21 100%	216±17 127%	246±6.2 ⁺⁺ 145%	225±23 Δ 133%
NA	630±46 100%	766±59 121%	749±68 119%	800±55 Δ 127%
5-HT	1453±69 100%	1306±67 90%	1399±64 96%	1268±79 87%
5-HIAA	257±30 100%	276±15 107%	359±19 ⁺ 140%	310±22 120%

Tabla 3. Metabolismo de las monoaminas en el sistema límbico de ratones WT y PK-KO. Los resultados están expresados en ng por g de tejido y como porcentaje respecto al control. Los valores se expresan como la media ± SEM (n = 6 animales por grupo experimental). El análisis estadístico utilizado fue un ANOVA de 1 vía seguido de un t-test de Student. * p<0.05; ratones tratados con cinarizina vs. control. + p<0.05; ++ p<0.01 ratones PK-KO vs. sus respectivos ratones WT. Δ p<0.05 ratones PK-KO tratados con cinarizina vs. ratones WT control.

ESTRIADO

	WT Control	WT cinarizina	PK-KO Control	PK-KO cinarizina
DA	10330±567 100%	12170±993 118%	12994±997 ⁺ 126%	13470±679 ΔΔ 130%
3-MT	334±18.9 100%	370±28 111%	445±35 ⁺ 133%	442±25 ΔΔ 132%
DOPAC	566±45 100%	590±42 104%	845±78 ⁺⁺ 149%	781±56 ΔΔ 139%
HVA	558±19.9 100%	625±45 112%	667±28+ 119%	607±29.6 109%
NA	252±11.6 100%	255±7.9 101%	315±12.6 ⁺⁺ 125%	344.5±5.3 * ΔΔ 137%
5-HT	823±29 100%	696±25 84%	810±51 98%	802±41 97%
5-HIAA	191±11 100%	202±13 105%	237±17+ 124%	221±11 116%

Tabla 4. Metabolismo de las monoaminas en el estriado de ratones WT y PK-KO.

Los resultados están expresados en ng por g de tejido y como porcentaje respecto al control. Los valores se expresan como la media ± SEM (n = 6 animales por grupo experimental). El análisis estadístico utilizado fue un ANOVA de 1 vía seguido de un t-test de Student. * p<0.05; ratones tratados con cinarizina vs. control. + p<0.05; ++ p<0.01 ratones PK-KO vs. sus respectivos ratones WT. ΔΔ p<0.01 ratones PK-KO tratados con cinarizina vs. ratones WT control.

MESENCÉFALO

	WT Control	WT cinarizina	PK-KO Control	PK-KO cinarizina
DA	199.6±14.3 100%	197±9.0 99%	216±13 108%	254±21 Δ 128%
DOPAC	81.5±10.2 100%	69.2±5 85%	86.3±3.7 105%	89.6±7.7 110%
HVA	99±10 100%	118±10 119%	115±2 116%	128±14 Δ 129%
NA	867±51 100%	965±25 111%	948±30 109%	969±13 112%
5-HT	1759±192 100%	1691±118 96%	1561±95 89%	1777±203 101%
5-HIAA	417±44 100%	432±38 103%	436±27 104%	416±40 100%

Tabla 5. Metabolismo de las monoaminas en el cerebro medio de ratones WT y PK-KO. Los resultados están expresados en ng por g de tejido y como porcentaje respecto al control. Los valores se expresan como la media ± SEM (n = 6 animales por grupo experimental). El análisis estadístico utilizado fue un ANOVA de 1 vía seguido de un t-test de Student.. Δ p<0.05 ratones PK-KO tratados con cinarizina vs. ratones WT control.

En un estudio previo, hemos descrito que la supresión de la actividad de la parkina modifica la liberación de DA, incrementando su metabolismo autooxidativo por la vía de MAO-B, que convierte cada molécula de DA en una molécula de H₂O₂ (Itier et al., 2003). La actividad de este sistema metabólico se podría estimar midiendo la relación DOPAC/DA. En la figura 33 confirmamos que la relación DOPAC/DA es mayor en el sistema límbico de los ratones PK/KO. También es mayor en el estriado pero la diferencia no es significativa. El tratamiento con cinarizina reduce significativamente esa relación en el sistema límbico de

los ratones PK-KO, mientras que no observamos ningún decremento en los ratones WT (Figura 34 A).

En relación con el metabolismo de 5-HT, que tiene lugar fundamentalmente a través de la enzima MAO- A, la ausencia de la actividad de la parkina junto con el tratamiento con cinarizina aumenta el metabolismo de esta vía (Fig. 34 B). Con respecto a la compartimentalización de las vías metabólicas de la DA, vía MAO (intracelular) y vía COMT (extracelular), podemos estimarla haciendo un cociente DOPAC/3-MT. Vemos que la supresión de la parkina incrementa el metabolismo vía MAO y el tratamiento con cinarizina revierte este fenómeno (Fig. 34 C).

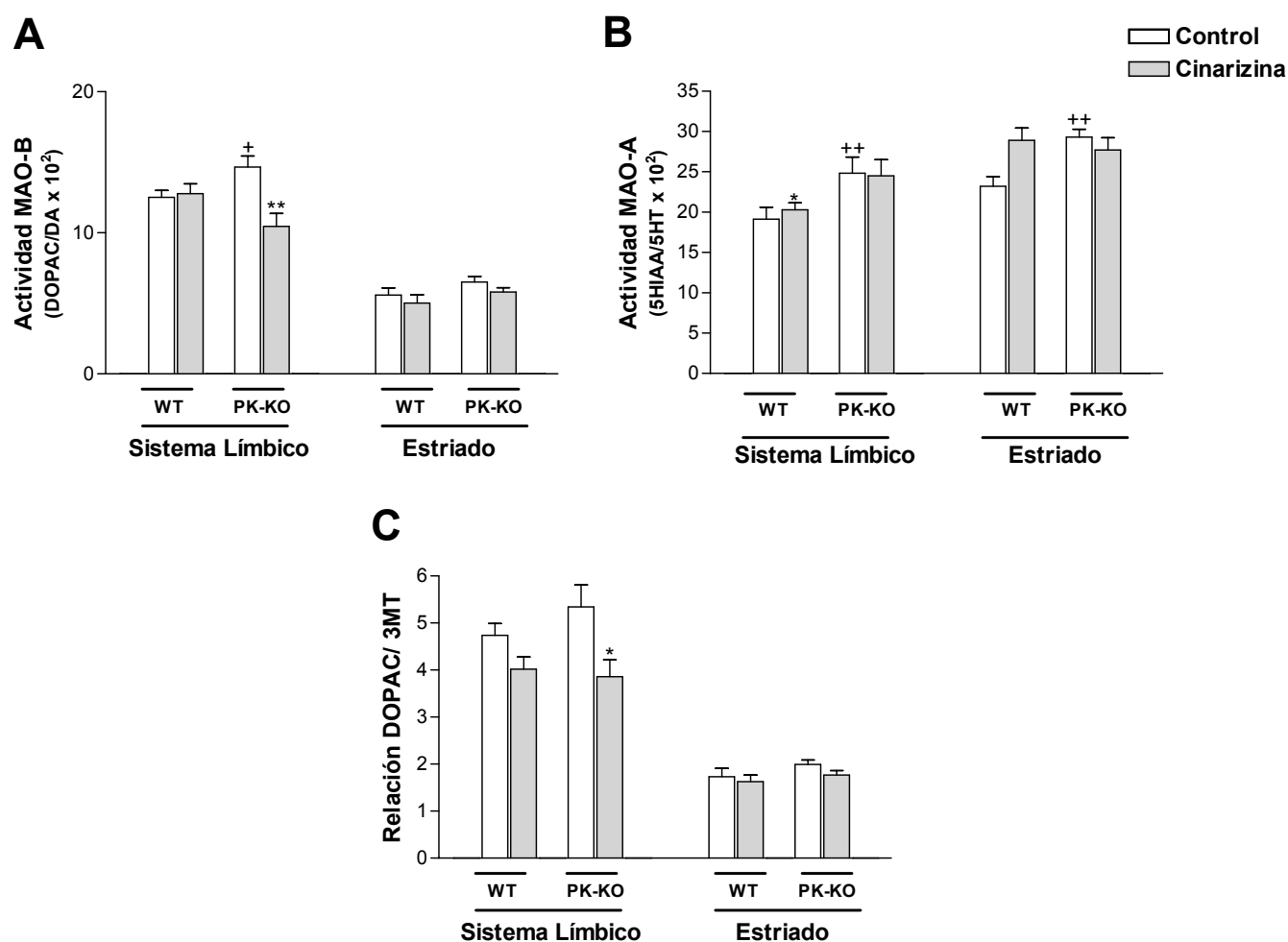


Figura 34. Efectos de la cinarizina sobre las actividades MAO y COMT en ratones WT y PK-KO. Los valores se expresan como la media \pm SEM (n = 6 animales por grupo experimental). El análisis estadístico utilizado fue un ANOVA de una vía seguido de un test Newman-Keuls. * p<0.05; ** p<0.01 ratones tratados con cinarizina vs sus respectivos controles; + p<0.05; ++ p<0.01 PK-KO vs sus respectivos ratones WT.

5.4 Efectos de la cinarizina sobre el metabolismo de GSH.

En un estudio previo hemos descrito que los ratones PK-KO tienen mayores niveles de GSH que los WT, lo que podría ser un mecanismo de compensación frente a la gran cantidad de radicales libres que se derivan de la autooxidación de la DA vía MAO (Itier et al., 2003). En este estudio confirmamos que, en el estriado de los ratones PK-KO, hay unos niveles significativamente mayores de GSH (Fig. 35). El tratamiento con cinarizina aumenta los niveles de GSH en el estriado de los ratones PK-KO aunque la diferencia no es significativa. No observamos ningún cambio en el estriado de los ratones WT al tratarlos con cinarizina.

Mediante estudios por Western Blot analizamos los efectos de la cinarizina sobre la expresión de marcadores neuronales y gliales y sobre la expresión de marcadores de supervivencia y muerte celular.

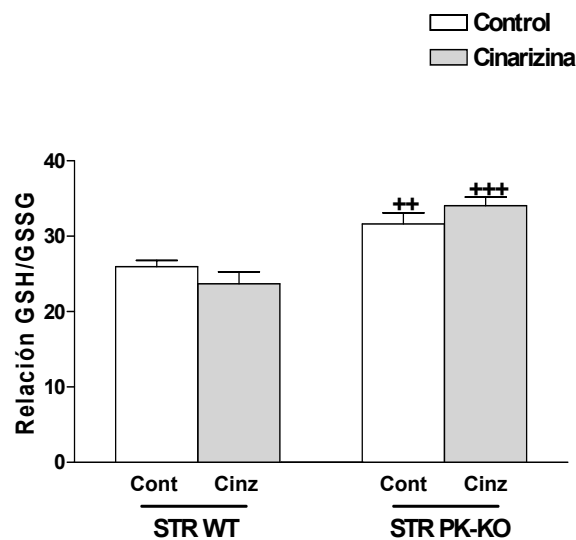


Figura 35. Efecto de la cinarizina sobre marcadores de estrés oxidativo en el estriado de ratones WT y PK-KO. Los valores se expresan como la media \pm SEM (n = 6 animales por grupo experimental). El análisis estadístico utilizado fue un ANOVA de 1 vía seguido de un test Newman-Keuls. ++ p<0.01; +++ p<0.001 PK-KO vs sus respectivos ratones WT.

5.5 Efectos de la cinarizina sobre la expresión de marcadores neuronales y gliales.

La cinarizina produce un aumento, aunque no es significativo, de la expresión de la TH en el estriado de los ratones WT, mientras que en las ratonas PK-KO no observamos ningún efecto (Fig. 36 A). Vemos que las ratonas PK-KO tienen una expresión menor de TH en el estriado y que la cinarizina no afecta dicha expresión.

La expresión de β -tubulina, una proteína que forma parte del citoesqueleto celular, no difiere entre el estriado de los ratones PK-KO y el de los WT y no se ve incrementada con el tratamiento con cinarizina (Fig. 36 B) en ninguno de los ratones. Se observa una tendencia a incrementarse la expresión de la tubulina y puede ser debido a que esa proteína es sustrato de la parkina y se cree que la supresión de la actividad de esta última conlleva un incremento de los niveles de tubulina (Ren et al., 2003). La expresión de un marcador específico de neuronas, como es la enolasa, no varía entre ratones WT y PK-KO y tampoco varía con el tratamiento con cinarizina (no mostrado).

El tratamiento con cinarizina, junto con la ausencia de actividad parkina, si tiene un efecto importante sobre la expresión de los marcadores gliales. Así, los niveles de GFAP, un marcador de astrogliá, están reducidos en los ratones PK-KO y esa disminución se ve incrementada con el tratamiento con cinarizina en todas las regiones estudiadas (Fig. 37 A, B y C). La cinarizina también reduce la expresión de marcadores de microglía (OX6) tanto en el estriado como en el mesencéfalo de los ratones PK-KO pero no en el sistema límbico (Fig. 37 D, E y F).

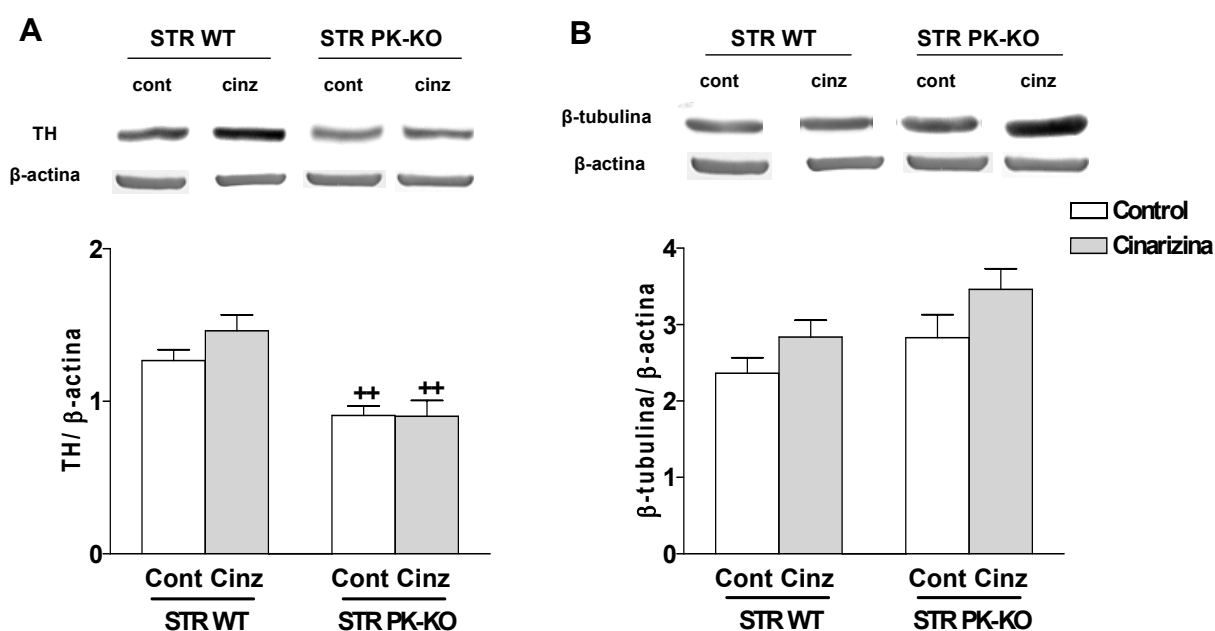


Figura 36. Expresión de marcadores neuronales en ratones controles y tratados con cinarizina. (A) WB representativo de tirosina hidroxilasa y (B) β -tubulina y sus histogramas correspondientes. Usamos β -actina como control de carga. Los valores se expresan como la media \pm SEM (n = 6 animales por grupo experimental). El análisis estadístico utilizado fue un ANOVA de una vía seguido de un test Newman-Keuls. ++ $p < 0.01$; +++ $p < 0.001$ PK-KO vs sus respectivos ratones WT.

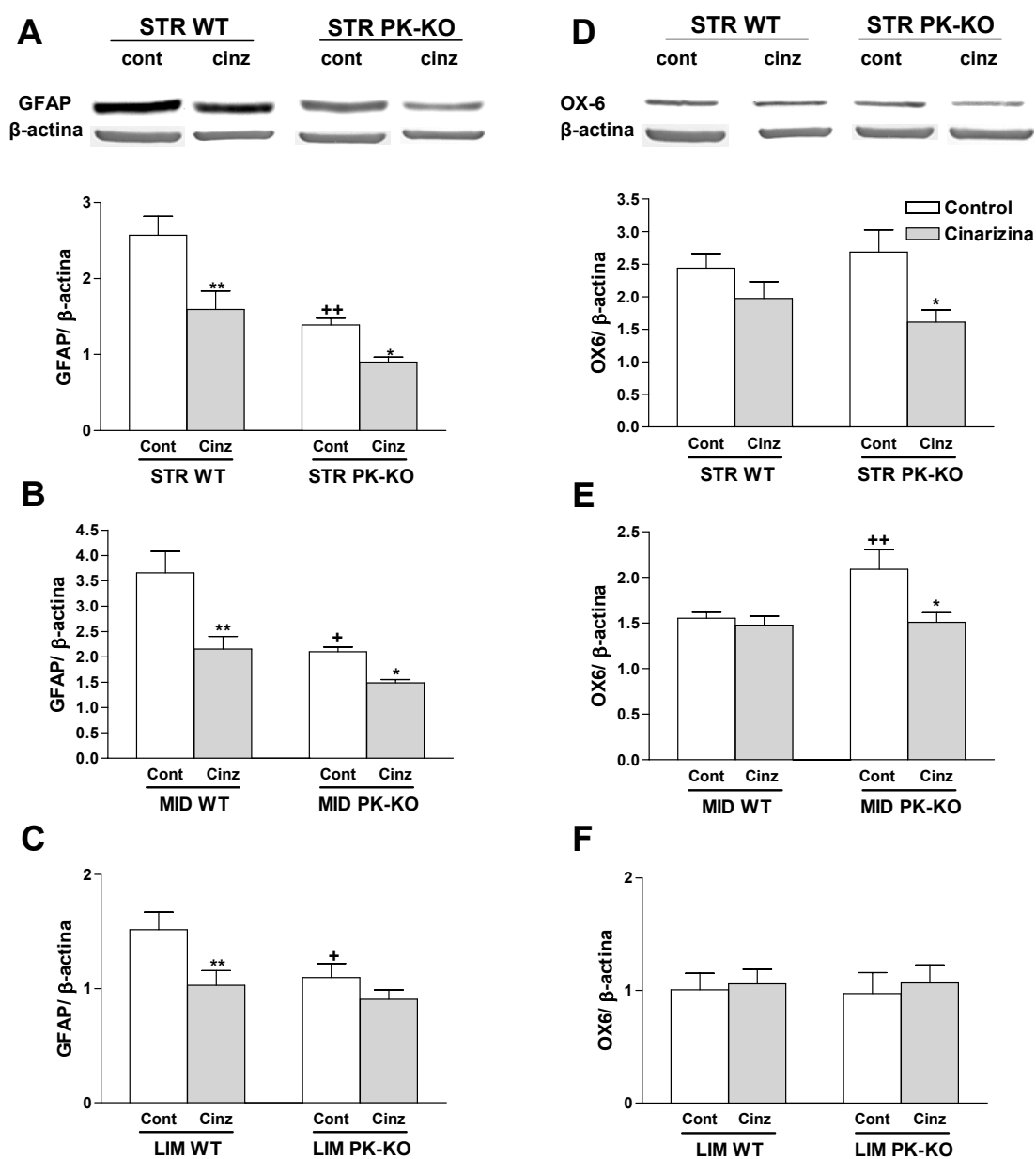


Figura 37. Expresión de marcadores gliales en ratones controles y tratados con cinarizina. (A) WB representativo de GFAP y (B) microglía activa (OX6) y sus histogramas correspondientes. Usamos β -actina como control de carga. Los valores se expresan como la media \pm SEM ($n = 6$ animales por grupo experimental). El análisis estadístico utilizado fue un ANOVA de una vía seguido de un test Newman-Keuls. * $p < 0.05$; *** $p < 0.001$ ratones tratados con cinarizina vs sus respectivos controles; + $p < 0.05$; ++ $p < 0.01$ PK-KO vs sus respectivos ratones WT.

5.6 Efecto de la cinarizina sobre la expresión de marcadores de supervivencia y muerte celular.

La relación de la expresión de las proteínas Bclx_{L/S} se considera un índice de actividad pro- apoptótica ya que Bclx_L es un marcador que nos indica supervivencia celular y Bclx_S es un marcador de muerte celular. En los ratones PK-KO hay una disminución de los niveles de Bclx_{L/S} en todas las regiones estudiadas aunque no es significativa salvo en la región del mesencéfalo (Fig. 38 A, B y C). Además, el tratamiento con cinarizina incrementa, en los ratones PK-KO, la actividad pro- apoptótica en todas las regiones estudiadas. Este efecto sólo se observa en el mesencéfalo de los ratones WT. Los efectos pro-apoptóticos de la cinarizina sobre los ratones PK-KO se confirman al observar unos niveles mayores de otra proteína pro-apoptótica, la proteína Bax, en todas las regiones estudiadas (no mostrado).

Estos resultados nos indican que la cinarizina podría inducir una muerte celular selectiva en regiones DAérgicas de ratones con especial susceptibilidad genética como son los ratones PK-KO.

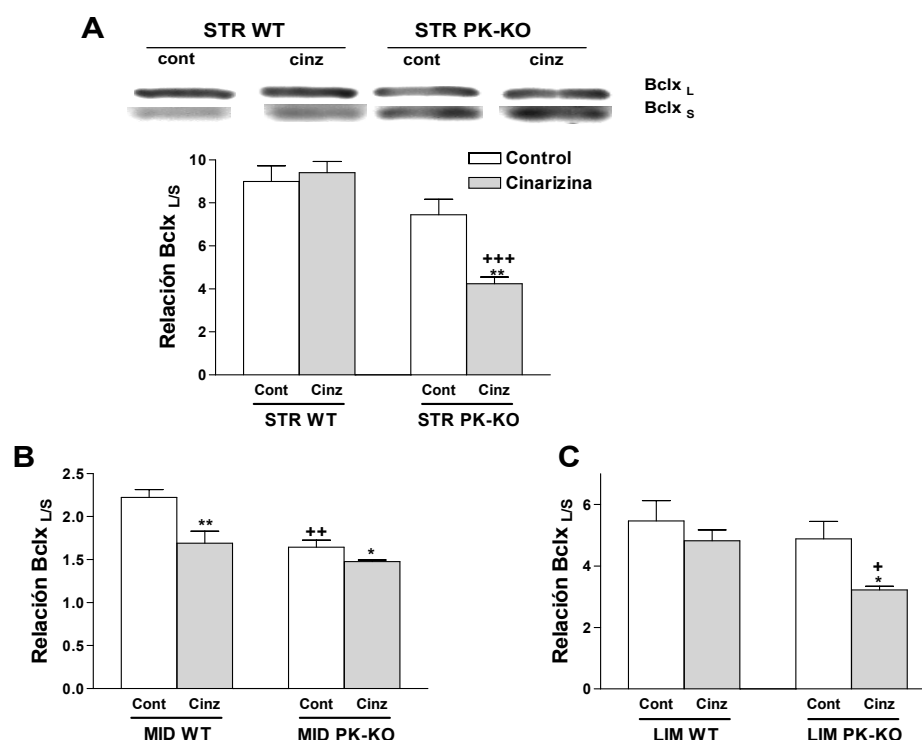


Figura 38. Expresión de marcadores de muerte celular en ratones controles y tratados con cinarizina. (A) WB representativo de proteínas Bclx_{L/S}. Los valores representan el cociente Bclx_{L/S} en estriado, (B) mesencéfalo y (C) sistema límbico. Los valores se expresan como la media \pm SEM (n = 6 animales por grupo experimental). El análisis estadístico utilizado fue un ANOVA de una vía seguido de un test Newman-Keuls. * p<0.05; ** p<0.01 ratones tratados con cinarizina vs sus respectivos controles; + p<0.05; ++ p<0.01; +++ p<0.001 PK-KO vs sus respectivos ratones WT.

V. DISCUSIÓN

1. Efectos diferenciales de la L-DOPA sobre el metabolismo de las monoaminas, la supervivencia celular y la producción de GSH de los cultivos enriquecidos en neuronas de ratones WT y PK-KO.

Este estudio demuestra que los cultivos mesencefálicos enriquecidos en neuronas procedentes de fetos E13 de ratones PK-KO son resistentes a la neurotoxicidad inducida por la L-DOPA que se produce en los cultivos neuronales procedentes de ratones WT.

Está descrito que la L-DOPA y las catecolaminas son factores críticos en la supervivencia y diferenciación de las células DAérgicas y que los efectos de la L-DOPA sobre las neuronas DAérgicas “in vivo” e “in vitro” pueden ser neurotróficos o neurotóxicos dependiendo del estado redox de las células (Mena et al., 1997). La L-DOPA es tóxica, a concentraciones relativamente bajas, en cultivos neuronales enriquecidos en neuronas (Mena et al., 1993; Mytilineou et al., 1993; Pardo et al., 1993) y, a dosis altas, al tratar cultivos de células NB69 procedentes de neuroblastoma humano en presencia de suero fetal (Mena et al., 1992). Por otro lado, observamos que la L-DOPA tiene efectos neurotróficos en otras condiciones experimentales como, por ejemplo, al tratar los cultivos de células NB69 en un medio definido sin suero (Rodríguez-Martín et al., 2001), en cultivos neuronales mesencefálicos a los que añadimos medio condicionado de glía (Mena et al., 1996; Mena et al., 1997) o en cocultivos neurona- astrocitos corticales (Mena et al., 1997; Mena et al., 2002).

En este trabajo vemos que los efectos neurotróficos o neurotóxicos de la L-DOPA no dependen únicamente de las condiciones en las que cultivamos las células sino también del fondo genético de las células. Las células procedentes de ratones mutantes para la proteína parkina son resistentes a la toxicidad inducida por la L-DOPA. Una reducción en los niveles endógenos de la proteína parkina hace que las células gliales sean más susceptibles a la muerte celular inducida tanto por el estrés producido por la DA como por el H₂O₂, pero no tiene ningún efecto sobre la muerte inducida por estaurosporina (MacCormac et al., 2004). Por otro lado, Ledesma (2002) ha descrito que se produce un aumento de la expresión de la proteína parkina en astrocitos durante el estrés producido por un mal plegamiento de las proteínas celulares.

La L-DOPA es el tratamiento más efectivo para pacientes parkinsonianos y el tratamiento con L-DOPA en animales de experimentación con lesiones que conllevan la denervación del estriado es capaz de inducir distintos efectos compensatorios (Murer et al., 1998; Datla et al., 2001; Ferrario et al., 2004). Además, la administración de L-DOPA acelera la recuperación funcional y el crecimiento axonal después de producirse una sección del cordón neural (Doyle and Roberts, 2004).

La determinación del mecanismo por el cual la L-DOPA ejerce sus efectos neurotróficos es importante y nuestros datos sugieren que no está mediado por las vías de

señalización de las MAPK ni de la PI3K. Así, la L-DOPA puede producir efectos neurotróficos a través de la regulación de los sistemas de detoxificación de las especies reactivas de oxígeno. El GSH juega un papel fundamental en dicha protección (Meister, 1988; Makar et al., 1994; Mena et al., 2002) y detoxifica el H_2O_2 que se produce en el metabolismo de la DA por la MAO (Werner and Cohen, 1993). Además, está descrito que la L-DOPA incrementa la síntesis de GSH en humanos (Toghi et al., 1995) y en cultivos “in vitro” (Han et al., 1996; Mena et al., 1997; Mena et al., 1998). Vemos que la L-DOPA produce un incremento de los niveles intracelulares de GSH. Han (1996) describió que la L-DOPA produce un incremento de los niveles de GSH en cultivos fetales mesencefálicos de ratas, en una línea de neuroblastoma de ratón, en neuroblastoma humano y en glía procedente de ratas. Además, la administración crónica de L-DOPA induce la sobreexpresión génica de un factor de crecimiento (pleiotropina), de mielina y de calmodulina en el estriado denervado de ratas lesionadas con 6-hidroxidopamina (Ferrario et al., 2004).

Las neuronas DAérgicas son más sensibles al estrés oxidativo debido a que están sometidas a un mayor estrés inducido por las especies reactivas de oxígeno producidas durante el metabolismo de la DA. El GSH es una molécula antioxidante que puede reducir los radicales libres. En los ratones PK-KO observamos unos niveles intracelulares mayores de GSH que en los ratones WT lo que se puede considerar un mecanismo de compensación frente al mayor estrés oxidativo al que están sometidos estos ratones. Esta afirmación se confirma porque la depleción de GSH con inhibidores de la síntesis de GSH suprime la protección frente al estrés oxidativo de los cultivos procedentes de ratones PK-KO.

Los ratones mutantes para el gen de la parkina se caracterizan porque tienen una denervación nigroestriatal, como demuestra el que tengan reducidos los niveles del transportador de DA (DAT) en el estriado (Itier et al., 2003) sin la existencia de una pérdida masiva neuronal en la sustancia nigra (Goldberg et al., 2003; Itier et al., 2003). Estos animales también presentan déficit mitocondriales (Palacino et al., 2004). Por esto, es muy probable que desarrollen sistemas más potentes de detoxificación de radicales libres respecto a los ratones salvajes. De hecho, existen evidencias que favorecen esta hipótesis como es la observación de unos niveles más altos de GSH en el estriado de estos ratones mutantes (Itier et al., 2003).

2. Los cultivos procedentes de ratones PK-KO son resistentes a la toxicidad inducida por un donador de óxido nítrico (DEA/NO).

Los donadores de NO ejercen su acción a través de la liberación espontánea de NO. A altas concentraciones, el NO produce un efecto neurotóxico sobre las neuronas DAérgicas

(Canals et al., 2001a). La muerte celular inducida por DEA/NO se produce tanto por mecanismos apoptóticos como necróticos.

Nuestros resultados sugieren que el DEA/NO es tóxico en los cultivos WT (medido por la disminución de células TH⁺, el aumento de células apoptóticas, el incremento en la actividad LDH y la disminución de la captación de ³H-DA en el cultivo) pero no afecta a los cultivos PK-KO.

En los efectos neurotóxicos del NO juegan un papel muy importante los mecanismos intracelulares de óxido-reducción, de modo que un ambiente reductor favorece la producción de radicales libres derivados del NO (Lipton et al., 1993; Smith et al., 1994). El NO reacciona con el anión superóxido y produce peroxinitrito que daña las proteínas por procesos de oxidación y nitración y de esa manera se inactiva la proteína TH (Ara et al., 1998; Kuhn et al., 1999). Así, la generación de NO y la consecuente formación de ONOO⁻ contribuyen a la muerte de las neuronas DAérgicas. El GSH es el antioxidante endógeno más potente y bloquea el daño inducido por el NO (LaVoie and Hastings, 1999).

Observamos que los cultivos PK-KO tienen unos niveles intracelulares de GSH mayores que los que existen en los cultivos WT, por lo que debe existir un mecanismo de compensación que protege los cultivos PK-KO de los efectos tóxicos del DEA/NO. Así mismo, vemos que la depleción de GSH en el cultivo PK-KO suprime por completo esa protección. Esta afirmación se ve corroborada por el aumento de los niveles de GSNO en los cultivos PK-KO al tratar dicho cultivo con DEA/NO, que indica la acción de un mecanismo potente de compensación frente al daño inducido por el NO.

Los ratones PK-KO se caracterizan por tener unos niveles del transportador de DA menores en el estriado respecto a los WT (Itier et al., 2003) sin una pérdida clara de neuronas y con alteraciones en la liberación de DA en la sustancia nigra (Itier et al., 2003; Von Coelln et al., 2004; Serrano et al., 2005). Estos animales tienen déficits mitocondriales (Palacino et al., 2004) y, probablemente, desarrollan mecanismos de protección más potentes frente a los radicales libres que los ratones WT. Así, los niveles de GSH están incrementados en el estriado al igual que en los cultivos mesencefálicos fetales de ratones PK-KO (Itier et al., 2003; Casarejos et al., 2005; Serrano et al., 2005). El GSH es un factor crítico que regula los efectos neurotróficos o neurotóxicos de las catecolaminas y otros donadores de radicales libres (Mena et al., 1997; Mena et al., 1998; Canals et al., 2001b; Canals et al., 2001a; Rodríguez-Martín et al., 2001; Canals et al., 2003a; Canals et al., 2003b; de Bernardo et al., 2003; Itier et al., 2003). De este modo, el incremento en los niveles y el metabolismo de las catecolaminas (que se produce en ratones PK-KO) conducen a un incremento de radicales libres que, en presencia de altos niveles de GSH, tiene un efecto neuroprotector en cultivos tanto de neuronas como de células de neuroblastoma humanas y de feocromocitoma de ratón (Mena et al., 1998; Mena et al.,

2002). La inhibición de la síntesis de GSH suprime la neuroprotección generando una elevada neurotoxicidad.

En conclusión, los efectos diferenciales del NO en los cultivos WT y PK-KO se deben a un mecanismo dependiente del GSH y los compuestos derivados del mismo. La nitrosilación de la parkina en los cultivos WT debe afectar el sistema degradativo del proteasoma y esto contribuye a la agregación proteica y la inducción de muerte neuronal (Bence et al., 2001; Dawson and Dawson, 2003; Chung et al., 2004; Yao et al., 2004).

3. Efectos de la rotenona, un inhibidor de la cadena respiratoria mitocondrial, en cultivos neuronales mesencefálicos primarios procedentes de ratones WT y PK-KO.

Aunque la etiología de la enfermedad de Parkinson idiopática continúa sin conocerse, existen estudios epidemiológicos que nos muestran la existencia de factores de riesgo que posibilitan el desarrollo de la EP, tales como la vida rural, la calidad del agua consumida o la exposición a determinados pesticidas (Priyadarshi et al., 2001). De todos estos factores de riesgo, la exposición a pesticidas o insecticidas es la que implica una mayor correlación con un incremento en la incidencia de la EP (Gorell et al., 1998; Ritz and Yu, 2000; Herishanu et al., 2001).

Betarbet (2000) describió que la administración crónica de un herbicida de uso común, la rotenona, producía la destrucción selectiva del sistema dopaminérgico nigrostriatal, la formación de inclusiones citoplasmáticas en las neuronas de la sustancia nigra y la inducción de hipocinesias y rigidez en ratas, reproduciendo las características de la EP en humanos. La muerte selectiva de las neuronas DAérgicas inducida por la rotenona se atribuye a la inhibición que produce este compuesto sobre el complejo I de la cadena respiratoria mitocondrial junto con la gran vulnerabilidad que sufren las neuronas DAérgicas al estrés oxidativo que se origina como consecuencia de la inhibición del complejo I de la cadena respiratoria mitocondrial (Greenamyre et al., 1999; Jenner, 2001).

El análisis de las mitocondrias aisladas de pacientes que desarrollaron una EP idiopática nos muestra que tienen disminuida la actividad NADH-ubiquinona reductasa y el complejo I de la cadena respiratoria mitocondrial y aumentada la producción de especies reactivas de oxígeno (Schapira, 1998).

Palacino (2004), en un modelo de ratón mutante para la proteína parkina, describió que estos ratones tienen disminuida la respiración mitocondrial, acompañada por cambios significativos en la fisiología de las mitocondrias. La reducción en la capacidad metabólica de la mitocondria está asociada con un incremento en la susceptibilidad a las ROS. La consecuencia de estas anomalías es que se detecta un aumento en los niveles de proteínas y lípidos oxidados en los cerebros de los ratones mutantes para el gen *park-2*. El daño oxidativo sobre los lípidos puede originar un incremento en los peróxidos lipídicos que

pueden producir un daño en el transportador de DA con la consecuente reducción en su actividad y el aumento de DA en el medio extracelular, incrementando el estrés oxidativo.

Como hemos visto en nuestro modelo con ratones PK-KO, el estrés oxidativo generado por tóxicos como la L-DOPA o el DEA/NO es contrarrestado por un aumento en los niveles intracelulares de GSH que compensa la carencia de la proteína parkina (Casarejos et al., 2006; Solano et al., 2006). Al tratar los cultivos mesencefálicos primarios de los ratones PK-KO con rotenona vemos que el efecto tóxico de este compuesto es dosis y tiempo dependiente y que el tratamiento con rotenona (0.05 μ M durante 24 h) produce un descenso en el número de células DAérgicas del cultivo PK-KO pero no en los cultivos WT. Gao (2002) describió que la rotenona a dosis de 25 nM disminuye significativamente el número de neuronas DAérgicas y la captación de alta afinidad para 3 H-DA en un cultivo mesencefálico primario enriquecido en neuronas pero no se ve afectada la captación de 3 H-GABA de forma significativa, lo que nos indica que el efecto de la rotenona es selectivo para las neuronas DAérgicas. En nuestro modelo, al estudiar el efecto de la rotenona sobre la población neuronal no DAérgica presente en el cultivo vemos que la rotenona, en los cultivos PK-KO, si produce un efecto neurotóxico significativo y que la muerte se produce, mayoritariamente, por apoptosis. Estos datos nos indican que la inactivación del complejo I de la cadena respiratoria mitocondrial desencadena un estrés oxidativo muy fuerte en los ratones PK-KO que conlleva una neurotoxicidad muy elevada sobre las neuronas presentes en el cultivo mesencefálico primario procedente de ratones PK-KO pero no en los WT.

La microglía son las células del sistema inmune residentes del cerebro (Kreutzberg, 1996; Gonzalez-Scarano and Baltuch, 1999). En condiciones normales las células de microglía juegan un papel fundamental en la protección de las neuronas del cerebro. La activación de la microglía en respuesta a un antígeno conlleva la liberación, por parte de las células de microglía, de distintos factores proinflamatorios y neurotóxicos (Chao et al., 1992; Liu et al., 2000; McGuire et al., 2001). De todos los factores que libera la microglía, las especies reactivas de oxígeno y, en concreto, los superóxidos parece que juegan un papel fundamental en la inflamación originada por el daño oxidativo sobre las neuronas. Una de las mayores fuentes de superóxido es el enzima NADPH oxidasa microglial (Babior, 1999). Como el mesencéfalo es una de las áreas con mayor población de microglía (Lawson et al., 1990; Kim et al., 2000), la activación de la microglía puede ser un suceso inicial en la degeneración de las neuronas DAérgicas presentes en la sustancia nigra como consecuencia de un conjunto de procesos que inducen un estrés oxidativo. Por eso, recientemente, hay varios estudios que demuestran que la activación de la microglía, indicador de la existencia de inflamación, juega un papel muy importante en la patogénesis de la EP (Vila et al., 2001; Liu and Hong, 2003). Gao (2003a) ha descrito la importancia que

tiene la NADPH oxidasa mitocondrial en la degeneración de las neuronas DAérgicas inducida por la rotenona.

Al estudiar la población de las células gliales presentes en los cultivos de nuestro modelo, vemos que se produce un incremento espectacular en el número de células de microglía en los cultivos PK-KO tratados con rotenona, acompañado de un aumento de los astrocitos, que se corresponde con un aumento de la apoptosis del cultivo. En los cultivos procedentes de los ratones WT vemos que, a las dosis en las que la rotenona es tóxica para los cultivos, se produce un incremento de las células de microglía pero de un modo más moderado que lo que observamos en los cultivos PK-KO. Si tenemos en cuenta que la liberación de superóxidos inducida por la rotenona está mediada por la NADPH oxidasa (Gao et al., 2003a), llevamos a cabo la inhibición de esta enzima (con apocinina) y vemos que el efecto tóxico inducido sobre los cultivos PK-KO por el tratamiento con rotenona desaparece. Esto nos indica que, probablemente, la microglía PK-KO libera una cantidad mayor de superóxido que la WT, lo que confirmamos al añadir microglía PK-KO sobre un cultivo enriquecido de neuronas WT. Al tratar en estas condiciones el cultivo WT con dosis de rotenona que no son tóxicas en condiciones normales, vemos que se produce un efecto tóxico sobre las neuronas DAérgicas, tanto al medir número de neuronas DAérgicas como al valorar la funcionalidad de las mismas.

Basándonos en el importante papel que juega la microglía en la toxicidad inducida por la rotenona, decidimos tratar los cultivos con inhibidores de la COX y de la NOS, ya que está descrito que los inhibidores de estas enzimas pueden modular la función de la microglía y la producción de citoquinas por parte de este grupo celular (Pyo et al., 1999; Choi et al., 2003b). En nuestro modelo, no vemos ningún efecto sobre la supervivencia de las neuronas DAérgicas en los cultivos PK-KO al usar los inhibidores de ambas enzimas.

Si la microglía, al activarse como consecuencia del tratamiento con rotenona, produce un gran estrés oxidativo que conduce a la degeneración de las neuronas DAérgicas y producimos una inhibición de esa activación, deberíamos observar una disminución de la toxicidad inducida por la rotenona. Para inhibir la activación de la microglía usamos minociclina que es una tetraciclina que puede cruzar la barrera hematoencefálica (Zhu et al., 2002; Domercq and Matute, 2004) y bloquea la proliferación de microglía. La minociclina tiene un efecto neuroprotector en modelos de isquemia cerebral (Yrjanheikki et al., 1998), esclerosis amiotrófica lateral (Zhang et al., 2003; McGeer and McGeer, 2005), enfermedad de Huntington (Chen et al., 2000; Bantubungi et al., 2005) y enfermedad de Parkinson (Du et al., 2001; Wu et al., 2002). Al inhibir la activación de la microglía con este antibiótico vemos que se produce una neuroprotección en los cultivos PK-KO frente al tratamiento con rotenona. De este modo, vemos que la degeneración de las neuronas DAérgicas inducida

por la rotenona es dependiente de la activación de la microglía y del consecuente incremento en la actividad de la NADPH oxidasa.

4. Modelo “in vivo”: efectos de la cinarizina, un antagonista del calcio que produce parkinsonismo en humanos, sobre los ratones mutantes para el gen park-2.

El parkinsonismo inducido por drogas puede clasificarse en dos tipos: transitorio y persistente. El parkinsonismo transitorio hace referencia a una interacción farmacológica reversible como puede ser el bloqueo de los receptores de DA, la depleción de DA, etc. El parkinsonismo persistente es el que se genera por los efectos tóxicos de las drogas sobre el sistema DAérgico. Algunas drogas como los neurolépticos o los antagonistas de los canales de Ca^{2+} pueden producir un parkinsonismo transitorio en algunos pacientes y persistente en otros (Garcia-Ruiz et al., 1992a; Marti-Masso and Poza, 1998; Negrotti and Calzetti, 1999). El fenotipo clínico que se observa en los pacientes que sufren un parkinsonismo inducido por antagonistas de Ca^{2+} es diferente del que encontramos en la enfermedad de Parkinson idiopática (Garcia-Ruiz et al., 1992a; Marti-Masso and Poza, 1998). Los síntomas tales como la depresión, falta de motivación y ausencia de expresión facial son más frecuentes en el parkinsonismo inducido por los antagonistas de Ca^{2+} que en la EP idiopática. Estos datos sugieren que el papel del sistema DAérgico nigroestriatal es menos importante en el parkinsonismo inducido por los antagonistas de Ca^{2+} , mientras que el sistema DAérgico mesolímbico parece que juega un papel central, de acuerdo con los fenómenos clínicos observados.

Se ha observado que el riesgo de padecer un parkinsonismo persistente tiene una base familiar. Myrianthopoulos, en 1967, ya describió que el riesgo de sufrir un parkinsonismo inducido por neurolépticos es mayor en individuos que tienen antecedentes familiares de EP. Garcia-Ruiz (1992b; 1992a) observó que también aumenta el riesgo de sufrir un parkinsonismo inducido por los antagonistas de Ca^{2+} en familias con antecedentes de EP. Con estos datos podemos pensar que el desarrollo de un parkinsonismo persistente está favorecido en individuos que tienen factores de riesgo genético.

El parkinsonismo inducido por los antagonistas de Ca^{2+} ha afectado a miles de pacientes en todo el mundo ya que las drogas basadas en antagonistas de Ca^{2+} se usaban comúnmente para tratar dolores de cabeza. Así, vemos que el desarrollo de un parkinsonismo inducido por los antagonistas de Ca^{2+} depende de factores ambientales pero también genéticos.

La cinarizina es un antagonista de Ca^{2+} que produce un descenso de la actividad neuronal (Desmedt et al., 1975), de la neurotransmisión de monoaminas (Mena et al., 1995) y disminución de los niveles de HVA en el líquido cerebrospinal de monos sanos (Garcia-Ruiz et al., 1992a) lo que sugiere que, incluso sin existir una disfunción DAérgica previa, la

cinarizina produce una reducción de la liberación de DA dependiente del calcio. La cinarizina inhibe los complejos I y II de la cadena respiratoria mitocondrial (Veitch and Hue, 1994). Como vimos en el caso de la rotenona, hay estudios que sugieren que la EP puede desarrollarse debido a un efecto tóxico sobre el complejo I de la cadena respiratoria mitocondrial causado por una inhibición endógena (Sayre et al., 1991) o por un compuesto tóxico ambiental (Walker, 1992). Por otro lado, hemos señalado previamente la disfunción mitocondrial y el consecuente daño oxidativo que sufren los ratones nulos para el gen de la proteína parkina (Palacino et al., 2004).

Los ratones PK-KO tienen un metabolismo de la DA alterado (Itier et al., 2003) al igual que un incremento en actividad MAO. En nuestro modelo observamos que el tratamiento con cinarizina induce la aparición de alopecias y cambios en el comportamiento de los ratones PK-KO consistentes en discinesias buco linguales y reducción de la actividad motora. Estos cambios en el comportamiento están relacionados con un aumento en los niveles de DA y con un aumento del turnover de DA, que es lo que observamos en estos ratones. El aumento del metabolismo de la DA que se observa hace que los niveles de GSH en los ratones tratados con cinarizina aumente. Al estudiar la expresión de marcadores neurales, como la TH, vemos que en los ratones PK-KO no se produce ningún cambio en la expresión de TH al realizar el tratamiento con cinarizina lo que sugiere que estos ratones no pueden adecuar el sistema DAérgico al aumento del metabolismo de las monoaminas. Este efecto se corresponde con el bloqueo de los receptores de DA y con la depleción de la DA que produce la cinarizina (Mena et al., 1995). Además vemos que el tratamiento con cinarizina produce una disminución de la astrogliá y aumenta la expresión de proteínas proapoptóticas en los ratones PK-KO.

Nuestros datos sugieren que el efecto tóxico de la cinarizina sobre el complejo I de la cadena respiratoria mitocondrial puede inducir un incremento en el estrés oxidativo lo que conduce a una mayor expresión de proteínas proapoptóticas y/o a un descenso de la protección neuronal debido a la pérdida de células de la glía. Hemos visto previamente que la microglía, en condiciones normales, tiene un efecto neuroprotector mediante la liberación de diferentes sustancias en respuesta a la acción de diferentes antígenos. La astrogliá, por su parte, también juega un papel importante en la supervivencia y funcionalidad de las neuronas DAérgicas (Mena et al., 1992) y esta función neuroprotectora está relacionada con la protección de las neuronas DAérgicas frente al estrés oxidativo. Con estos datos podemos postular que la pérdida de la defensa que ejercen las células gliales, junto con la disfunción mitocondrial que tienen los ratones PK-KO, puede llevar a un aumento en la producción de radicales libres que hace que los ratones PK-KO sean más susceptibles a la acción tóxica de la cinarizina.

5. Papeles de la proteína parkina en neuroprotección.

5.1 Papel de la proteína parkina como E3 ubiquitin ligasa. Interacción con otras proteínas.

El sistema del proteasoma es muy importante en la catalización de muchos procesos celulares: ciclo celular, reparación del ADN, muerte celular, transducción de señales, transcripción, metabolismo y respuesta inmune (Hershko and Ciechanover, 1998; Pickart, 2001; Weissman, 2001). Además de estas funciones, el sistema del proteasoma juega un papel fundamental en la respuesta al estrés y la homeostasis proteica (Goldberg et al., 2001; Sherman and Goldberg, 2001; Yoshida et al., 2003). Numerosos estudios demuestran la importancia del sistema del proteasoma en la aparición y desarrollo de enfermedades neurodegenerativas, particularmente en la EP. El fallo del sistema del proteasoma conduce a una situación de estrés, por acumulación de proteínas, que desencadena la muerte de las neuronas DAérgicas que son especialmente sensibles.

Ya hemos descrito que una mutación en el gen *park-2* produce la aparición de la EP autosómica recesiva en la que se produce una pérdida de las neuronas DAérgicas, lo que nos indica que la proteína parkina tiene una importancia vital en la supervivencia de esas neuronas. La parkina juega un papel importante en el sistema del proteasoma debido a su actividad E3 ubiquitin ligasa por la que cataliza la unión de una cadena de ubiquitina a proteínas específicas como señal para su posterior degradación (Imai et al., 2000; Shimura et al., 2000; Zhang et al., 2000). La pérdida de la función de la proteína parkina hace que no se degraden proteínas que deberían ser eliminadas por la vía del proteasoma, resultando muy tóxico para las neuronas DAérgicas.

Una de las características más aparentes de la EP autosómica recesiva es la ausencia, por lo general, de cuerpos de Lewy. Estudios bioquímicos recientes muestran los componentes proteicos de los cuerpos de Lewy que incluyen α -sinucleína, UCH-L1, parkina, sinfilina-1 y chaperonas (Cookson, 2003; Giasson and Lee, 2003; McNaught and Olanow, 2003). El porqué de la agregación de estas proteínas en los cuerpos de Lewy es desconocida pero se pueden clasificar en dos tipos de proteínas dependiendo de su origen: 1) proteínas muy abundantes en el cerebro que son fáciles de ser susceptibles de sufrir una desnaturalización y formar así agregados y 2) proteínas que juegan un papel en la reparación o la degradación de proteínas malformadas en la célula. Entre estas proteínas se encontraría la parkina.

Así, los cuerpos de Lewy se formarían como respuesta a una pérdida del control de calidad de las proteínas en la célula, surgiendo como mecanismo de neuroprotección (la formación de inclusiones intracelulares parece que es un proceso beneficioso para las células). Además, está descrito que la parkina también interviene en procesos de

neuroprotección (Cookson, 2003; Giasson and Lee, 2003). Por esto, la ausencia de los cuerpos de Lewy en la EP autosómica recesiva es consistente con las posibles funciones neuroprotectoras de la proteína parkina y de los cuerpos de Lewy y también con el inicio temprano de la enfermedad.

En los ratones mutantes para el gen de la proteína parkina no se observan acúmulos de ninguno de los sustratos de la parkina. El estudio en profundidad del sistema del proteasoma en estos ratones no mostrará la relevancia de la función E3 ubiquitin ligasa de la proteína parkina y su implicación en la EP, ya que, además de los defectos consecuencia de la pérdida de la función de la proteína parkina, deben existir más factores que actúan conjuntamente con la parkina causando la degeneración de las neuronas DAérgicas ya que esta proteína se expresa en la mayoría de las neuronas del cerebro.

Por eso, los factores ambientales deben jugar algún papel en el proceso de la enfermedad. Se postula que, además de existir una pérdida de función de algunas proteínas debido a mutaciones genéticas, deben existir unas condiciones ambientales determinadas para que se dispare el comienzo de la enfermedad. En la EP autosómica recesiva se ha visto que la disfunción mitocondrial, que induce un fuerte estrés oxidativo, puede jugar un papel central en la aparición de EP autosómica recesiva junto con la pérdida de función oxidativa (Mizuno et al., 1998; Palacino et al., 2004).

Hemos comentado anteriormente que la proteína parkina tiene una función neuroprotectora. Estudios recientes muestran esta acción neuroprotectora de la parkina de modo que su sobre- expresión disminuye el daño oxidativo (Hyun et al., 2002; Jiang et al., 2006; Klein et al., 2006). Por el contrario, la ausencia de esta proteína aumenta el daño oxidativo (Palacino et al., 2004; Greene et al., 2005; Casarejos et al., 2006). La acción neuroprotectora de la parkina puede ser mediante: 1) papel en la regulación de la expresión génica, que estudiaremos más adelante y 2) actividad E3 ubiquitin ligasa y la asociación con diversos sustratos.

Además de la función E3 ubiquitin ligasa por la que puede realizar una función neuroprotectora eliminando otras proteínas que pueden resultar tóxicas para la célula, la parkina puede tener función neuroprotectora mediante la asociación e interacción con otras proteínas. En este aspecto tiene mucha importancia las interacciones de la parkina con la proteína tau. La proteína tau es una proteína que se asocia a los microtúbulos y juega un papel fundamental en el sistema de transporte neuronal. Una disfunción de la proteína tau es tóxica para las neuronas ya que se produce una hiperfosforilación de la proteína y se forman agregados (Buee et al., 2000). Estos agregados de la proteína tau se pueden identificar en muchas enfermedades neurodegenerativas como la enfermedad de Alzheimer, demencia frontotemporal con parkinsonismo asociado al cromosoma 17, parálisis supranuclear progresiva (PSP) y degeneración corticobasal (Santacruz et al., 2005). Tau

interacciona con muchas proteínas en el cerebro. La interacción más conocida es la de tau con los microtúbulos. Experimentos “in vitro” muestran una interacción entre tau y α -sinucleína (Mamah et al., 2005). También existe una asociación entre tau y el péptido β -amiloide (Katsuno et al., 2005). Fe65, uno de los ligandos de la proteína precursora del péptido amiloide, también se asocia a tau “in vivo” e “in vitro” (Barbato et al., 2005).

Dada la implicación de tau en algunos casos de parkinsonismo, es importante conocer si existe alguna interacción entre tau y parkina. Van de Warremburg (2001) indicó que la parkina juega un papel en el procesamiento de tau mediante su actividad ubiquitin ligasa. Más recientemente, Yang y sus colegas (2005) han encontrado que la parkina es esencial para la estabilización de la tubulina en los microtúbulos. Klein y su equipo han visto que la parkina juega un papel fundamental en la protección de las neuronas DAérgicas de la sustancia nigra frente a la neurotoxicidad inducida por la proteína tau (Klein et al., 2006) aunque continúan siendo desconocidos los mecanismos por los que lleva a cabo esta acción.

En nuestro laboratorio hemos estudiado, mediante la creación de ratones dobles transgénicos deficientes en proteína parkina y que sobre- expresan la proteína tau humana, que la ausencia de la proteína parkina junto con la sobre- expresión de tau conduce a una muerte selectiva de las neuronas DAérgicas de la sustancia nigra (Menendez et al., 2006). Este efecto parece ser debido a que los ratones dobles transgénicos no son capaces de compensar el estrés oxidativo generado por el aumento del metabolismo de la DA ya que no detectamos mayores niveles de GSH, algo que si se observa en los ratones deficientes en parkina (Itier et al., 2003). Además de la incapacidad de compensar el incremento del estrés oxidativo, parece que hay otros mecanismos implicados en la muerte celular que se observa en los ratones dobles transgénicos como puede ser la relación de la expresión entre proteínas pro- y anti- apoptóticas o los cambios de distribución celular de la proteína tau.

La falta de la proteína parkina puede hacer que tau no se asocie a los microtúbulos y este hecho puede conducir a dos efectos deletéreos: 1) disfunción del sistema de transporte neuronal y 2) incremento de tau en el citosol, siendo así susceptible de ser fosforilada y formar agregados. Nuestros datos indican que la ausencia de la parkina puede conducir a un desequilibrio en la función del proteasoma de modo que tau no se degrada correctamente y se produce neurotoxicidad.

De este modo, los mecanismos que tienen lugar en determinadas enfermedades aparentemente esporádicas pueden ser debidas a efectos de mutaciones en múltiples genes pero que son insuficientes para que se produzca la aparición de un fenotipo clínico. Por eso, la identificación de factores de riesgo genéticos, y no sólo de mutaciones, puede ser crucial en la investigación y tratamiento de las enfermedades neurodegenerativas.

5.2 Papel de la proteína parkina en la regulación de la expresión génica.

Generalmente se suele afirmar que la ausencia de la proteína parkina conlleva un acúmulo de los sustratos de la parkina dada su función dentro del sistema del proteasoma como E3 ubiquitin ligasa y, consecuentemente, la muerte selectiva de las neuronas DAérgicas en la enfermedad de Parkinson.

Hay estudios recientes que sugieren que la parkina tiene funciones independientes de la función E3 ubiquitin ligasa. Así, la parkina tiene dos dominios RING- finger en la región C- terminal que son característicos de proteínas que juegan un papel importante en la regulación de la expresión génica (Morett and Bork, 1999).

Una de las posibles causas de la muerte selectiva de las neuronas DAérgicas en la EP puede ser, como ya hemos citado anteriormente, la autooxidación de la DA (Jenner and Olanow, 1996). Además, el metabolismo de la DA por medio de la vía de las monoamino oxidasas genera muchas especies reactivas de oxígeno: una molécula de H_2O_2 por cada molécula de DA metabolizada.

La sobre- expresión de la proteína parkina tiene un efecto neuroprotector en una línea de células DAérgicas procedentes de neuroblastoma humano reduciendo la apoptosis inducida por la oxidación de la DA ya que se disminuye la generación de ROS (Jiang et al., 2004). Esto es posible porque la parkina disminuye la expresión de las MAO a nivel de ARN y reduce la aparición de ROS que se producen por la oxidación de la DA por medio de esta vía (Jiang et al., 2006).

Ya hemos descrito anteriormente que los ratones mutantes para el gen que codifica la proteína parkina tienen el metabolismo de la DA alterado y, en concreto, detectamos que tienen aumentada la actividad MAO (Itier et al., 2003; Menendez et al., 2006). De esta forma, es posible que la proteína parkina juegue un papel fundamental en la regulación de la expresión génica y en la reducción del estrés oxidativo que se produce en las neuronas DAérgicas.

VI. CONCLUSIONES

1. Los cultivos de mesencéfalo de ratones nulos para la proteína Parkina tienen una distribución celular normal, incluyendo el porcentaje de células de dopamina, salvo un aumento de los niveles de microglía.

2. Los cultivos neuronales primarios procedentes de mesencéfalo de ratones nulos para la proteína Parkina (PK-KO) tienen un incremento del metabolismo de la dopamina, del estrés oxidativo y de la concentración de glutatión (GSH).

3. Estos cultivos son más resistentes que los controles al tratamiento con agentes, como la L- DOPA y donadores de óxido nítrico (DEA/NO), cuya neurotoxicidad está mediada por medio de la liberación de radicales libres. El efecto diferencial del tratamiento con L- DOPA y DEA/NO en los cultivos primarios mesencefálicos procedentes de ratones WT y PK-KO se debe a un mecanismo dependiente de la homeostasis del GSH y de los compuestos derivados del mismo (GSNO), produciéndose más GSH con el tratamiento con L- DOPA y más GSNO con el tratamiento con el donador de óxido nítrico.

4. Los cultivos de neuronas mesencefálicas nulas para la Parkina son más susceptibles que los controles a los efectos neurotóxicos de la rotenona. El aumento de la susceptibilidad a la rotenona está mediado por la activación de la microglía y puede neutralizarse con el tratamiento con compuestos como la minociclina y la apocinina que inhiben la activación de la microglía y protegen de la toxicidad inducida por rotenona.

5. Los ratones PK-KO son más susceptibles a los efectos tóxicos de la cinarizina que los controles. La cinarizina no modifica el metabolismo de la dopamina ni los niveles de GSH. El efecto tóxico de la cinarizina sobre los ratones PK-KO puede estar mediado a través de su efecto inhibitor sobre los complejos I y II de la cadena respiratoria mitocondrial o por su efecto sobre la disponibilidad de Ca^{2+} en la célula.

VII. BIBLIOGRAFÍA

- Ahmadi FA, Linseman DA, Grammatopoulos TN, Jones SM, Bouchard RJ, Freed CR, Heidenreich KA, Zawada WM (2003) The pesticide rotenone induces caspase-3-mediated apoptosis in ventral mesencephalic dopaminergic neurons. *J Neurochem* 87:914-921.
- Alam M, Schmidt WJ (2002) Rotenone destroys dopaminergic neurons and induces parkinsonian symptoms in rats. *Behav Brain Res* 136:317-324.
- Allam MF, Del Castillo AS, Navajas RF (2005) Parkinson's disease risk factors: genetic, environmental, or both? *Neurol Res* 27:206-208.
- Andersen JK (2004) Iron dysregulation and Parkinson's disease. *J Alzheimers Dis* 6:S47-52.
- Ara J, Przedborski S, Naini AB, Jackson-Lewis V, Trifiletti RR, Horwitz J, Ischiropoulos H (1998) Inactivation of tyrosine hydroxylase by nitration following exposure to peroxynitrite and 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP). *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:7659-7663.
- Babior BM (1999) NADPH oxidase: an update. *Blood* 93:1464-1476.
- Bae YJ, Park KS, Kang SJ (2003) Genomic organization and expression of parkin in *Drosophila melanogaster*. *Exp Mol Med* 35:393-402.
- Bantubungi K, Jacquard C, Greco A, Pintor A, Chtarto A, Tai K, Galas MC, Tenenbaum L, Deglon N, Popoli P, Minghetti L, Brouillet E, Brotchi J, Levivier M, Schiffmann SN, Blum D (2005) Minocycline in phenotypic models of Huntington's disease. *Neurobiol Dis* 18:206-217.
- Barbato C, Canu N, Zambrano N, Serafino A, Minopoli G, Ciotti MT, Amadoro G, Russo T, Calissano P (2005) Interaction of Tau with Fe65 links tau to APP. *Neurobiol Dis* 18:399-408.
- Barbeau A, Roy M, Bernier G, Campanella G, Paris S (1987) Ecogenetics of Parkinson's disease: prevalence and environmental aspects in rural areas. *Can J Neurol Sci* 14 (1):36-41.
- Bashkatova V, Alam M, Vanin A, Schmidt WJ (2004) Chronic administration of rotenone increases levels of nitric oxide and lipid peroxidation products in rat brain. *Exp Neurol* 186:235-241.
- Beal MF (2001) Experimental models of Parkinson's disease. *Nat Rev Neurosci* 2:325-334.
- Beart PM, McDonald D (1980) Neurochemical studies of the mesolimbic dopaminergic pathway: somatodendritic mechanisms and GABAergic neurons in rat ventral tegmentum. *J Neurochem* 34:1622-1629.
- Beites CL, Xie H, Bowser R, Trimble WS (1999) The septin CDCrel-1 binds syntaxin and inhibits exocytosis. *Nat Neurosci* 2:434-439.
- Bence NF, Sampat RM, Kopito RR (2001) Impairment of the ubiquitin-proteasome system by protein aggregation. *Science* 292:1552-1555.

- Betarbet R, Sherer TB, MacKenzie G, Garcia-Osuna M, Panov AV, Greenamyre JT (2000) Chronic systemic pesticide exposure reproduces features of Parkinson's disease. *Nat Neurosci* 3:1301-1306.
- Bonifati V, Rizzu P, van Baren MJ, Schaap O, Breedveld GJ, Krieger E, Dekker MC, Squitieri F, Ibanez P, Joosse M, van Dongen JW, Vanacore N, van Swieten JC, Brice A, Meco G, van Duijn CM, Oostra BA, Heutink P (2003) Mutations in the DJ-1 gene associated with autosomal recessive early-onset parkinsonism. *Science* 299:256-259.
- Brewer GJ, Torricelli JR, Evege EK, Price PJ (1993) Optimized survival of hippocampal neurons in B27-supplemented Neurobasal, a new serum-free medium combination. *J Neurosci Res* 35:567-576.
- Brunet A, Datta SR, Greenberg ME (2001) Transcription-dependent and -independent control of neuronal survival by the PI3K-Akt signaling pathway. *Curr Opin Neurobiol* 11:297-305.
- Buee L, Bussiere T, Buee-Scherrer V, Delacourte A, Hof PR (2000) Tau protein isoforms, phosphorylation and role in neurodegenerative disorders. *Brain Res Brain Res Rev* 33:95-130.
- Canals S, Casarejos MJ, Rodríguez-Martín E, de Bernardo S, Mena MA (2001a) Neurotrophic and neurotoxic effects of nitric oxide on fetal midbrain cultures. *J Neurochem* 76:56-68.
- Canals S, Casarejos MJ, de Bernardo S, Rodríguez-Martín E, Mena MA (2001b) Glutathione depletion switches nitric oxide neurotrophic effects to cell death in midbrain cultures: implications for Parkinson's disease. *J Neurochem* 79:1183-1195.
- Canals S, Casarejos MJ, de Bernardo S, Rodríguez-Martín E, Mena MA (2003a) Nitric oxide triggers the toxicity due to glutathione depletion in midbrain cultures through 12-lipoxygenase. *J Biol Chem* 278:21542-21549.
- Canals S, Casarejos MJ, de Bernardo S, Solano RM, Mena MA (2003b) Selective and persistent activation of extracellular signal-regulated protein kinase by nitric oxide in glial cells induces neuronal degeneration in glutathione-depleted midbrain cultures. *Mol Cell Neurosci* 24:1012-1026.
- Carlsson A, Lindqvist M (1973) Effect of ethanol on the hydroxylation of tyrosine and tryptophan in rat brain in vivo. *J Pharm Pharmacol* 25:437-440.
- Casarejos MJ, Menendez J, Solano RM, Rodriguez-Navarro JA, Garcia de Yebenes J, Mena MA (2006) Susceptibility to rotenone is increased in neurons from parkin null mice and is reduced by minocycline. *J Neurochem* 97:934-946.
- Casarejos MJ, Solano RM, Menendez J, Rodriguez-Navarro JA, Correa C, Garcia De Yebenes J, Mena MA (2005) Differential effects of L-DOPA on monoamine

- metabolism, cell survival and GSH production in midbrain neuronal-enriched cultures from *parkin* knock out and wild type mice. *J Neurochem* 94:1005-1014.
- Chao CC, Hu S, Molitor TW, Shaskan EG, Peterson PK (1992) Activated microglia mediate neuronal cell injury via a nitric oxide mechanism. *J Immunol* 149:2736-2741.
- Chen M, Ona VO, Li M, Ferrante RJ, Fink KB, Zhu S, Bian J, Guo L, Farrell LA, Hersch SM, Hobbs W, Vonsattel JP, Cha JH, Friedlander RM (2000) Minocycline inhibits caspase-1 and caspase-3 expression and delays mortality in a transgenic mouse model of Huntington disease. *Nat Med* 6:797-801.
- Choi P, Snyder H, Petrucelli L, Theisler C, Chong M, Zhang Y, Lim K, Chung KK, Kehoe K, D'Adamio L, Lee JM, Cochran E, Bowser R, Dawson TM, Wolozin B (2003a) SEPT5_v2 is a parkin-binding protein. *Brain Res Mol Brain Res* 117:179-189.
- Choi SH, Joe E-H, Jin BK (2003b) Thrombin- induced microglial activation produces degeneration of nigral dopaminergic neurons in vivo. *J Neurosci* 23:5877-5886.
- Chung KK, Thomas B, Li X, Pletnikova O, Troncoso JC, Marsh L, Dawson VL, Dawson TM (2004) S-nitrosylation of parkin regulates ubiquitination and compromises parkin's protective function. *Science* 304:1328-1331.
- Chung KK, Zhang Y, Lim KL, Tanaka Y, Huang H, Gao J, Ross CA, Dawson VL, Dawson TM (2001) Parkin ubiquitinates the alpha-synuclein-interacting protein, synphilin-1: implications for Lewy-body formation in Parkinson disease. *Nat Med* 7:1144-1150.
- Ciechanover A, Brundin P (2003) The ubiquitin proteasome system in neurodegenerative diseases: sometimes the chicken, sometimes the egg. *Neuron* 40:427-446.
- Cookson MR (2003) Neurodegeneration:How does parkin prevent parkinson's disease? *Curr Biol* 13:522-524.
- Cookson MR, Xiomerisiou G, Singleton A (2005) How genetics research in Parkinson's disease is enhancing understanding of the common idiopathic forms of the disease. *Curr Opin Neurol* 18:706-711.
- Corti O, Hampe C, Koutnikova H, Darios F, Jacquier S, Prigent A, Robinson JC, Pradier L, Ruberg M, Mirande M, Hirsch E, Rooney T, Fournier A, Brice A (2003) The p38 subunit of the aminoacyl-tRNA synthetase complex is a Parkin substrate: linking protein biosynthesis and neurodegeneration. *Hum Mol Genet* 12:1427-1437.
- Coulom H, Birman S (2004) Chronic exposure to rotenone models sporadic Parkinson's disease in *Drosophila melanogaster*. *J Neurosci* 24:10993-10998.
- Coyle JT, Puttfarcken P (1993) Oxidative stress, glutamate, and neurodegenerative disorders. *Science* 262:689-695.
- Culetto E, Sattelle DB (2000) A role for *Caenorhabditis elegans* in understanding the function and interactions of human disease genes. *Hum Mol Genet* 9:869-877.

- Datla KP, Blunt SB, Dexter DT (2001) Chronic L-DOPA administration is not toxic to the remaining dopaminergic nigrostriatal neurons, but instead may promote their functional recovery, in rats with partial 6-OHDA or FeCl(3) nigrostriatal lesions. *Mov Disord* 16:424-434.
- Dauer W, Przedborski S (2003) Parkinson's disease: mechanisms and models. *Neuron* 39:889-909.
- Dawson TM, Dawson VL (2003) Molecular pathways of neurodegeneration in Parkinson's disease. *Science* 302:819-822.
- Dawson TM, Dawson VL, Snyder SH (1992) A novel neuronal messenger molecule in brain: the free radical, nitric oxide. *Ann Neurol* 32:297-311.
- de Bernardo S, Canals S, Casarejos MJ, Mena MA (2003) Glia-conditioned medium induces de novo synthesis of tyrosine hydroxylase and increases dopamine cell survival by differential signaling pathways. *J Neurosci Res* 73:818-830.
- de Bernardo S, Canals S, Casarejos MJ, Solano RM, Menendez J, Mena MA (2004) Role of extracellular signal-regulated protein kinase in neuronal cell death induced by glutathione depletion in neuron/glia mesencephalic cultures. *J Neurochem* 91:667-682.
- Decker T, Lohmann-Matthes ML (1988) A quick and simple method for the quantitation of lactate dehydrogenase release in measurements of cellular cytotoxicity and tumor necrosis factor (TNF) activity. *J Immunol Methods* 115:61-69.
- Desmedt LK, Niemegeers CJ, Janssen PA (1975) Anticonvulsive properties of cinnarizine and flunarizine in rats and mice. *Arzneimittelforschung* 25:1408-1413.
- Diaz-Corrales FJ, Asanuma M, Miyazaki I, Miyoshi K, Ogawa N (2005) Rotenone induces aggregation of gamma-tubulin protein and subsequent disorganization of the centrosome: relevance to formation of inclusion bodies and neurodegeneration. *Neuroscience* 133:117-135.
- Domercq M, Matute C (2004) Neuroprotection by tetracyclines. *Trends Pharmacol Sci* 25:609-612.
- Doyle LM, Roberts BL (2004) Functional recovery and axonal growth following spinal cord transection is accelerated by sustained L-DOPA administration. *Eur J Neurosci* 20:2008-2014.
- Du Y, Ma Z, Lin S, Dodel RC, Gao F, Bales KR, Triarhou LC, Chernet E, Perry KW, Nelson DL, Luecke S, Phebus LA, Bymaster FP, Paul SM (2001) Minocycline prevents nigrostriatal dopaminergic neurodegeneration in the MPTP model of Parkinson's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:14669-14674.

- Dziewczapolski G, Murer G, Agid Y, Gershanik O, Raisman-Vozari R (1997) Absence of neurotoxicity of chronic L-DOPA in 6-hydroxydopamine-lesioned rats. *Neuroreport* 8:975-979.
- Engelender S, Kaminsky Z, Guo X, Sharp AH, Amaravi RK, Kleiderlein JJ, Margolis RL, Troncoso JC, Lanahan AA, Worley PF, Dawson VL, Dawson TM, Ross CA (1999) Synphilin-1 associates with alpha-synuclein and promotes the formation of cytosolic inclusions. *Nat Genet* 22:110-114.
- Ferrario JE, Taravini IR, Mourlevat S, Stefano A, Delfino MA, Raisman-Vozari R, Murer MG, Ruberg M, Gershanik O (2004) Differential gene expression induced by chronic levodopa treatment in the striatum of rats with lesions of the nigrostriatal system. *J Neurochem* 90:1348-1358.
- Gao H-M, Liu B, Hong J-S (2003a) Critical role for microglial NADPH oxidase in rotenone-induced degeneration of dopaminergic neurons. *J Neurosci* 23:6181-6187.
- Gao H-M, Hong J-S, Zhang W, Liu B (2002) Distinct role for microglia in rotenone-induced degeneration of dopaminergic neurons. *J Neurosci* 22:782-790.
- Gao H-M, Hong JS, Zhang W, Liu B (2003b) Synergistic dopaminergic neurotoxicity of the pesticide rotenone and inflammogen lipopolysaccharide: relevance to the etiology of Pstkinson's disease. *J Neurosci* 23:1228-1236.
- Garcia-Ruiz PJ, Mena MA, Penafiel N, De Yebenes JG (1992a) Cinnarizine-induced parkinsonism in primates. *Clin Neuropharmacol* 15:152-154.
- Garcia-Ruiz PJ, Garcia de Yebenes J, Jimenez-Jimenez FJ, Vazquez A, Garcia Urra D, Morales B (1992b) Parkinsonism associated with calcium channel blockers: a prospective follow-up study. *Clin Neuropharmacol* 15:19-26.
- Gates MA, Torres EM, White A, Fricker-Gates RA, Dunnett SB (2006) Re-examining the ontogeny of substantia nigra dopamine neurons. *Eur J Neurosci* 23:1384-1390.
- Giasson BI, Lee VM (2003) Are ubiquitination pathways central to Parkinson's disease? *Cell* 114:1-8.
- Golbe LI, Di Iorio G, Bonavita V, Miller DC, Duvoisin RC (1990) A large kindred with autosomal dominant Parkinson's disease. *Ann Neurol* 27:276-282.
- Goldberg AL, Elledge SJ, Harper JW (2001) The cellular chamber of doom. *Sci Am* 284:68-73.
- Goldberg MS, Fleming SM, Palacino JJ, Cepeda C, Lam HA, Bhatnagar A, Meloni EG, Wu N, Ackerson LC, Klapstein GJ, Gajendiran M, Roth BL, Chesselet MF, Maidment NT, Levine MS, Shen J (2003) Parkin-deficient mice exhibit nigrostriatal deficits but not loss of dopaminergic neurons. *J Biol Chem* 278:43628-43635.
- Gonzalez-Scarano F, Baltuch G (1999) Microglia as mediators of inflammatory and degenerative diseases. *Annu Rev Neurosci* 22:219-240.

- Good PF, Hsu A, Werner P, Perl DP, Olanow CW (1998) Protein nitration in Parkinson's disease. *J Neuropathol Exp Neurol* 57:338-342.
- Gorell JM, Johnson CC, Rybicki BA, Peterson EL, Richardson RJ (1998) The risk of Parkinson's disease with exposure to pesticides, farming, well water, and rural living. *Neurology* 50:1346-1350.
- Gowers W (1902) A manual of the diseases of the Nervous Sistem. Blakiston, Philadelphia.
- Greenamyre JT, MacKenzie G, Peng TI, Stephans SE (1999) Mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease. *Biochem Soc Symp* 66:85-97.
- Greene JC, Whitworth AJ, Andrews LA, Parker TJ, Pallanck LJ (2005) Genetic and genomic studies of Drosophila parkin mutants implicate oxidative stress and innate immune responses in pathogenesis. *Hum Mol Genet* 14:799-811.
- Griffith OW (1982) Mechanism of action, metabolism, and toxicity of buthionine sulfoximine and its higher homologs, potent inhibitors of glutathione synthesis. *J Biol Chem* 257:13704-13712.
- Han S-K, Mytilineou C, Cohen G (1996) L-DOPA up-regulates glutathione and protects mesencephalic cultures against oxidative stress. *J Neurochem* 66:501-510.
- Hastings TG, Lewis DA, Zigmond MJ (1996) Role of oxidation in the neurotoxic effects of intrastriatal dopamine injections. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:1956-1961.
- Hefti F, Melamed E, Bhawan J, Wurtman RJ (1981) Long-term administration of L-DOPA does not damage dopaminergic neurons in the mouse. *Neurology* 31:1194-1195.
- Herishanu YO, Medvedovski M, Goldsmith JR, Kordysh E (2001) A case-control study of Parkinson's disease in urban population of southern Israel. *Can J Neurol Sci* 28:144-147.
- Hershko A, Ciechanover A (1998) The ubiquitin system. *Annu Rev Biochem* 67:425-479.
- Hirsch EC, Hunot S, Damier P, Brugg B, Faucheux BA, Michel PP, Ruberg M, Muriel MP, Mouatt-Prigent A, Agid Y (1999) Glial cell participation in the degeneration of dopaminergic neurons in Parkinson's disease. In: *Parkinson's disease: Advances in Neurology* (Stern GM, Lippincott W, Wikins, eds), pp 9-18. Philadelphia.
- Hoglinger GU, Carrard G, Michel PP, Medja F, Lombes A, Ruberg M, Friguet B, Hirsch EC (2003) Dysfunction of mitochondrial complex I and the proteasome: interactions between two biochemical deficits in a cellular model of Parkinson's disease. *J Neurochem* 86:1297-1307.
- Horowitz JM, Myers J, Stachowiak MK, Torres G (1999) Identification and distribution of Parkin in rat brain. *Neuroreport* 10:3393-3397.
- Hsu YT, Wolter KG, Youle RJ (1997) Cytosol-to-membrane redistribution of Bax and Bcl-X_L during apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:3668.

- Hunot S, Boissière F, Faucheux B, Brugg B, Mouatt-Prigent A, Agid Y, Hirsch EC (1996) Nitric oxide synthase and neuronal vulnerability in Parkinson' disease. *Neuroscience* 72:355-363.
- Huynh DP, Scoles DR, Nguyen D, Pulst SM (2003) The autosomal recessive juvenile Parkinson disease gene product, parkin, interacts with and ubiquitinates synaptotagmin XI. *Hum Mol Genet* 12:2587-2597.
- Hyun DH, Lee M, Hattori N, Kubo S, Mizuno Y, Halliwell B, Jenner P (2002) Effect of wild-type or mutant Parkin on oxidative damage, nitric oxide, antioxidant defenses, and the proteasome. *J Biol Chem* 277:28572-28577.
- Ichinose H, Ohye T, Suzuki T, Sumi-Ichinose C, Nomura T, Hagino Y, Nagatsu T (1999) Molecular cloning of the human Nurr1 gene: characterization of the human gene and cDNAs. *Gene* 230:233-239.
- Imai Y, Soda M, Takahashi R (2000) Parkin suppresses unfolded protein stress-induced cell death through its E3 ubiquitin-protein ligase activity. *J Biol Chem* 275:35661-35664.
- Imai Y, Soda M, Inoue H, Hattori N, Mizuno Y, Takahashi R (2001) An unfolded putative transmembrane polypeptide, which can lead to endoplasmic reticulum stress, is a substrate of Parkin. *Cell* 105:891-902.
- Itier JM, Ibanez P, Mena MA, Abbas N, Cohen-Salmon C, Bohme GA, Laville M, Pratt J, Corti O, Pradier L, Ret G, Joubert C, Periquet M, Araujo F, Negroni J, Casarejos MJ, Canals S, Solano R, Serrano A, Gallego E, Sanchez M, Deneffe P, Benavides J, Tremp G, Rooney TA, Brice A, Garcia de Yébenes J (2003) Parkin gene inactivation alters behaviour and dopamine neurotransmission in the mouse. *Hum Mol Genet* 12:2277-2291.
- Jenner P (2001) Parkinson's disease, pesticides and mitochondrial dysfunction. *Trends Neurosci* 24:245-247.
- Jenner P (2003) Oxidative stress in Parkinson's disease. *Ann Neurol* 53 Suppl 3:S26-36; discussion S36-28.
- Jenner P, Olanow CW (1996) Oxidative stress and the pathogenesis of Parkinson's disease. *Neurology* 47:S161-170.
- Jenner P, Olanow CW (2006) The pathogenesis of cell death in Parkinson's disease. *Neurology* 66:S24-36.
- Jiang H, Ren Y, Zhao J, Feng J (2004) Parkin protects human dopaminergic neuroblastoma cells against dopamine-induced apoptosis. *Hum Mol Genet* 13:1745-1754.
- Jiang H, Jiang Q, Liu W, Feng J (2006) Parkin suppresses the expression of monoamine oxidases. *J Biol Chem* 281:8591-8599.
- Jimenez-Jimenez FJ, Garcia-Ruiz PJ, Molina JA (1997) Drug-induced movement disorders. *Drug Saf* 16:180-204.

- Julien JP, Mushynski WE (1998) Neurofilaments in health and disease. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 61:1-23.
- Katsuno T, Morishima-Kawashima M, Saito Y, Yamanouchi H, Ishiura S, Murayama S, Ihara Y (2005) Independent accumulations of tau and amyloid beta-protein in the human entorhinal cortex. *Neurology* 64:687-692.
- Kim WG, Mohney RP, Wilson B, Jeohn GH, Liu B, Hong JS (2000) Regional difference in susceptibility to lipopolysaccharide-induced neurotoxicity in the rat brain: role of microglia. *J Neurosci* 20:6309-6316.
- Kitada T, Asakawa S, Minoshima S, Mizuno Y, Shimizu N (2000) Molecular cloning, gene expression, and identification of a splicing variant of the mouse parkin gene. *Mamm Genome* 11:417-421.
- Kitada T, Asakawa S, Hattori N, Matsumine H, Yamamura Y, Minoshima S, Yokochi M, Mizuno Y, Shimizu N (1998) Mutations in the *parkin* gene cause autosomal recessive juvenile parkinsonism. *Nature* 392:605-608.
- Kittur S, Hoh J, Endo H, Tourtellotte W, Weeks BS, Markesbery W, Adler W (1994) Cytoskeletal neurofilament gene expression in brain tissue from Alzheimer's disease patients. I. Decrease in NF-L and NF-M message. *J Geriatr Psychiatry Neurol* 7:153-158.
- Klein RL, Dayton RD, Henderson KM, Petrucelli L (2006) Parkin is protective for substantia nigra dopamine neurons in a tau gene transfer neurodegeneration model. *Neurosci Lett* 401:130-135.
- Konradi C, Kornhuber J, Froelich L, Fritze J, Heinsen H, Beckmann H, Schulz E, Riederer P (1989) Demonstration of monoamine oxidase-A and -B in the human brainstem by a histochemical technique. *Neuroscience* 33:383-400.
- Kreutzberg GW (1996) Microglia: a sensor for pathological events in the CNS. *Trends Neurosci* 19:312-318.
- Kuhn DM, Aretha CW, Geddes TJ (1999) Peroxynitrite inactivation of tyrosine hydroxylase: mediation by sulfhydryl oxidation, not tyrosine nitration. *J Neurosci* 19:10289-10294.
- Lapointe N, St-Hilaire M, Martinoli MG, Blanchet J, Gould P, Rouillard C, Cicchetti F (2004) Rotenone induces non-specific central nervous system and systemic toxicity. *FASEB J* 18:717-719.
- Lauder JM, Petrusz P, Wallace JA, Dinome A, Wilkie MB, McCarthy K (1982) Combined serotonin immunocytochemistry and 3H-thymidine autoradiography: in vivo and in vitro methods. *J Histochem Cytochem* 30:788-793.
- LaVoie MJ, Hastings TG (1999) Peroxynitrite- and nitrite-induced oxidation of dopamine: implications for nitric oxide in dopaminergic cell loss. *J Neurochem* 73:2546-2554.

- Lawson LJ, Perry VH, Dri P, Gordon S (1990) Heterogeneity in the distribution and morphology of microglia in the normal adult mouse brain. *Neuroscience* 39:151-170.
- Ledesma MD, Galvan C, Hellias B, Dotti C, Jensen PH (2002) Astrocytic but not neuronal increased expression and redistribution of parkin during unfolded protein stress. *J Neurochem* 83:1431-1440.
- Leroy E, Boyer R, Auburger G, Leube B, Ulm G, Mezey E, Harta G, Brownstein MJ, Jonnalagada S, Chernova T, Dehejia A, Lavedan C, Gasser T, Steinbach PJ, Wilkinson KD, Polymeropoulos MH (1998) The ubiquitin pathway in Parkinson's disease. *Nature* 395:451-452.
- Levine AJ (1997) p53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell* 88:323.
- Liberatore GT, Jackson-Lewis V, Vukosavic S, Mandir AS, Vila M, McAuliffe WG, Dawson VL, Dawson TM, Przedborski S (1999) Inducible nitric oxide synthase stimulates dopaminergic neurodegeneration in the MPTP model of Parkinson disease. *Nature Med* 5:1403-1409.
- Liou HH, Tsai MC, Chen CJ, Jeng JS, Chang YC, Chen SY, Chen RC (1997) Environmental risk factors and Parkinson's disease: a case-control study in Taiwan. *Neurology* 48:1583-1588.
- Lipton SA, Choi YB, Pan ZH, Lei SZ, Chen HS, Sucher NJ, Loscalzo J, Singel DJ, Stamler JS (1993) A redox-based mechanism for the neuroprotective and neurodestructive effects of nitric oxide and related nitroso-compounds. *Nature* 364:626-632.
- Liu B, Hong J-S (2003) Role of microglia in inflammation- mediated neurodegenerative diseases: mechanisms and strategies for therapeutic intervention. *J Pharmacol Exp Ther* 304:1-7.
- Liu B, Du L, Hong JS (2000) Naloxone protects rat dopaminergic neurons against inflammatory damage through inhibition of microglia activation and superoxide generation. *J Pharmacol Exp Ther* 293:607-617.
- Luo Y, Umegaki H, Wang X, Abe R, Roth GS (1998) Dopamine induces apoptosis through an oxidation-involved SAPK/JNK activation pathway. *J Biol Chem* 273:3756-3764.
- MacCormac LP, Muqit MM, Faulkes DJ, Wood NW, Latchman DS (2004) Reduction in endogenous parkin levels renders glial cells sensitive to both caspase-dependent and caspase-independent cell death. *Eur J Neurosci* 20:2038-2048.
- Makar TK, Nedergaard M, Preuss A, Gelbard AS, Perumal AS, Cooper AJL (1994) Vitamin E, ascorbate, glutathione, glutathione disulfide, and enzymes of glutathione metabolism in cultures of chick astrocytes and neurons: evidence that astrocytes play an important role in antioxidative processes in the brain. *J Neurochem* 62:45-53.

- Mamah CE, Lesnick TG, Lincoln SJ, Strain KJ, de Andrade M, Bower JH, Ahlskog JE, Rocca WA, Farrer MJ, Maraganore DM (2005) Interaction of alpha-synuclein and tau genotypes in Parkinson's disease. *Ann Neurol* 57:439-443.
- Marti-Masso JF, Poza JJ (1998) Cinnarizine-induced parkinsonism: ten years later. *Mov Disord* 13:453-456.
- McGeer EG, McGeer PL (2005) Pharmacologic approaches to the treatment of amyotrophic lateral sclerosis. *Bio Drugs* 19:31-37.
- McGuire SO, Ling ZD, Lipton JW, Sortwell CE, Collier TJ, Carvey PM (2001) Tumor necrosis factor alpha is toxic to embryonic mesencephalic dopamine neurons. *Exp Neurol* 169:219-230.
- McNaught KS, Olanow CW (2003) Proteolytic stress: a unifying concept for the etiopathogenesis of Parkinson's disease. *Ann Neurol* 53:S73-84.
- Meister A (1988) Glutathione metabolism and its selective modification. *J Biol Chem* 263:17205-17208.
- Mena MA, Casarejos MJ, García de Yébenes J (1998) Neurotrophic factors for the treatment of neurological disorders. The model of Parkinson's disease. In: *Strategies for studying brain disorders* (Palomo T, Archer T, Beninger RJ, eds). Madrid-London: Editorial Complutense and Farrand Press.
- Mena MA, Pardo B, Paino CL, De Yébenes JG (1993) Levodopa toxicity in foetal rat midbrain neurones in culture: modulation by ascorbic acid. *Neuroreport* 4:438-440.
- Mena MA, Pardo B, Casarejos MJ, Fahn S, Garcia de Yébenes J (1992) Neurotoxicity of levodopa on catecholamine-rich neurons. *Mov Disord* 7:23-31.
- Mena MA, Casarejos MJ, Carazo A, Paino CL, Garcia de Yébenes J (1996) Glia conditioned medium protects fetal rat midbrain neurones in culture from L-DOPA toxicity. *Neuroreport* 7:441-445.
- Mena MA, Casarejos MJ, Carazo A, Paíno CL, García de Yébenes J (1997) Glia protects midbrain dopamine neurons in culture from L-DOPA toxicity through multiple mechanisms. *J Neural Transm* 104:317-328.
- Mena MA, de Bernardo S, Casarejos MJ, Canals S, Rodríguez-Martín E (2002) The role of astroglia on the survival of dopamine neurons. *Mol Neurobiol* 25:245-263.
- Mena MA, Garcia de Yébenes MJ, Tabernero C, Casarejos MJ, Pardo B, Garcia de Yébenes J (1995) Effects of calcium antagonists on the dopamine system. *Clin Neuropharmacol* 18:410-426.
- Mena MA, García de Yébenes J, Dwork A, Fahn S, Latov N, Herbert J, Flaster E, Slonim D (1989) Biochemical properties of monoamine-rich human neuroblastoma cells. *Brain Res* 486:286-296.

- Menendez J, Rodriguez-Navarro JA, Solano RM, Casarejos MJ, Rodal I, Guerrero R, Sanchez MP, Avila J, Mena MA, de Yebenes JG (2006) Suppression of parkin enhances nigrostriatal and motor neuron lesion in mice over-expressing human mutated tau protein. *Hum Mol Genet. In press*.
- Michel PP, Hefti F (1990) Toxicity of 6-hydroxydopamine and dopamine for dopaminergic neurons in culture. *J Neurosci Res* 26:428-435.
- Mizuno Y, Yoshino H, Ikebe S, Hattori N, Kobayashi T, Shimoda-Matsubayashi S, Matsumine H, Kondo T (1998) Mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease. *Ann Neurol* 44:S99-109.
- Mizuno Y, Ohta S, Tanaka M, Takamiya S, Suzuki K, Sato T, Oya H, Ozawa T, Kagawa Y (1989) Deficiencies in complex I subunits of the respiratory chain in Parkinson's disease. *Biochem Biophys Res Commun* 163:1450-1455.
- Moon Y, Lee KH, Park JH, Geum D, Kim K (2005) Mitochondrial membrane depolarization and the selective death of dopaminergic neurons by rotenone: protective effect of coenzyme Q10. *J Neurochem* 93:1199-1208.
- Moore DJ, Dawson VL, Dawson TM (2003) Role for the ubiquitin-proteasome system in Parkinson's disease and other neurodegenerative brain amyloidoses. *Neuromol Med* 4:95-108.
- Morett E, Bork P (1999) A novel transactivation domain in parkin. *Trends Biochem Sci* 24:229-231.
- Murer G, Dziewczapolski G, Menalled LB, García MC, Agid Y, Gershanik O, Raisman-Vozari R (1998) Chronic levodopa is not toxic for remaining dopamine neurons, but instead promotes their recovery, in rats with moderate nigrostriatal lesions. *Ann Neurol* 43:561-575.
- Murphy MP (1999) Nitric oxide and cell death. *Biochim Biophys Acta* 1411:401-414.
- Mytilineou C, Han SK, Cohen G (1993) Toxic and protective effects of L-DOPA on mesencephalic cell cultures. *J Neurochem* 61:1470-1478.
- Negrotti A, Calzetti S (1999) Cinnarizine-induced parkinsonism: ten years later. *Mov Disord* 14:534-535.
- Olanow CW, Agid Y, Mizuno Y, Albanese A, Bonucelli U, Damier P, De Yebenes J, Gershanik O, Guttman M, Grandas F, Hallett M, Hornykiewicz O, Jenner P, Katzenschlager R, Langston WJ, LeWitt P, Melamed E, Mena MA, Michel PP, Mytilineou C, Obeso JA, Poewe W, Quinn N, Raisman-Vozari R, Rajput AH, Rascol O, Sampaio C, Stocchi F (2004) Levodopa in the treatment of Parkinson's disease: current controversies. *Mov Disord* 19:997-1005.

- Palacino JJ, Sagi D, Goldberg MS, Krauss S, Motz C, Wacker M, Klose J, Shen J (2004) Mitochondrial dysfunction and oxidative damage in parkin-deficient mice. *J Biol Chem* 279:18614-18622.
- Pardo B, Mena MA, García de Yébenes J (1995a) L-DOPA inhibits complex IV of the electron transport chain in catecholamine-rich human neuroblastoma NB69 cells. *J Neurochem* 64:576-582.
- Pardo B, Mena MA, Fahn S, de Yébenes JG (1993) Ascorbic acid protects against levodopa-induced neurotoxicity on a catecholamine-rich human neuroblastoma cell line. *Mov Disord* 8:268-273.
- Pardo B, Paíno CL, Casarejos MJ, Mena MA (1997) Neuronal-enriched cultures from embryonic rat ventral mesencephalon for pharmacological studies of dopamine neurons. *Brain Res Protocols* 1:127-132.
- Pardo B, Mena MA, Casarejos MJ, Paíno CL, de Yébenes JG (1995b) Toxic effects of L-DOPA on mesencephalic cell cultures: protection with antioxidants. *Brain Res* 682:133-143.
- Pickart CM (2001) Mechanisms underlying ubiquitination. *Annu Rev Biochem* 70:503-533.
- Polymeropoulos MH, Higgins JJ, Golbe LI, Johnson WG, Ide SE, Di Iorio G, Sanges G, Stenroos ES, Pho LT, Schaffer AA, Lazzarini AM, Nussbaum RL, Duvoisin RC (1996) Mapping of a gene for Parkinson's disease to chromosome 4q21-q23. *Science* 274:1197-1199.
- Priyadarshi A, Khuder SA, Schaub EA, Priyadarshi SS (2001) Environmental risk factors and Parkinson's disease: a metaanalysis. *Environ Res* 86:122-127.
- Przedborski S, Jackson-Lewis V, Yokoyama T, Shibata T, Dawson VL, Dawson TM (1996) Role of neuronal nitric oxide in 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP)-induced dopaminergic neurotoxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:4565-4571.
- Pyo H, Jou I, Jung S, Joe E (1999) cAMP potentiates beta-amyloid-induced nitric oxide release from microglia. *Neuroreport* 10:37-40.
- Raff MC, Miller RH, Noble M (1983) A glial progenitor cell that develops in vitro into an astrocyte or an oligodendrocyte depending on the culture medium. *Nature* 303:390-396.
- Rajput AH, Uitti RJ (1987) Paraquat and Parkinson's disease. *Neurology* 37:1820-1821.
- Rauhala P, Lin AM-Y, Chiueh CC (1998) Neuroprotection by S-nitrosoglutathione of brain dopamine neurons from oxidative stress. *FASEB J* 12:165-173.
- Ren Y, Zhao J, Feng J (2003) Parkin binds to alpha/beta tubulin and increases their ubiquitination and degradation. *J Neurosci* 23:3316-3324.
- Ritz B, Yu F (2000) Parkinson's disease mortality and pesticide exposure in California 1984-1994. *Int J Epidemiol* 29:323-329.

- Rodríguez-Martín E, Casarejos MJ, Canals S, de Bernardo S, Mena MA (2002) Thiolic antioxidants protect from nitric oxide-induced toxicity in fetal midbrain cultures. *Neuropharmacology* 43:877-888.
- Rodríguez-Martín E, Casarejos MJ, Bazán E, Canals S, Herranz AS, Mena MA (2000) Nitric oxide induces differentiation in the NB69 human catecholamine-rich cell line. *Neuropharmacology* 39:2090-2100.
- Rodríguez-Martín E, Canals S, Casarejos MJ, de Bernardo S, Handler A, Mena MA (2001) L-DOPA and glia-conditioned medium have additive effects on tyrosine hydroxylase expression in human catecholamine-rich neuroblastoma NB69 cells. *J Neurochem* 78:535-545.
- Ryu EJ, Harding HP, Angelastro JM, Vitolo OV, Ron D, Greene LA (2002) Endoplasmic reticulum stress and the unfolded protein response in cellular models of Parkinson's disease. *J Neurosci* 22:10690-10698.
- Salinas M, Diaz R, Abraham NG, Ruiz de Galarreta CM, Cuadrado A (2003) Nerve growth factor protects against 6-hydroxydopamine-induced oxidative stress by increasing expression of heme oxygenase-1 in a phosphatidylinositol 3-kinase-dependent manner. *J Biol Chem* 278:13898-13904.
- Santacruz K, Lewis J, Spires T, Paulson J, Kotilinek L, Ingelsson M, Guimaraes A, DeTure M, Ramsden M, McGowan E, Forster C, Yue M, Orne J, Janus C, Mariash A, Kuskowski M, Hyman B, Hutton M, Ashe KH (2005) Tau suppression in a neurodegenerative mouse model improves memory function. *Science* 309:476-481.
- Sayre LM, Wang FJ, Arora PK, Riachi NJ, Harik SI, Hoppel CL (1991) Dopaminergic neurotoxicity in vivo and inhibition of mitochondrial respiration in vitro by possible endogenous pyridinium-like substances. *J Neurochem* 57:2106-2115.
- Schapira AH (1998) Mitochondrial dysfunction in neurodegenerative disorders. *Biochim Biophys Acta* 1366:225-233.
- Schapira AH, Cooper JM, Dexter D, Clark JB, Jenner P, Marsden CD (1990) Mitochondrial complex I deficiency in Parkinson's disease. *J Neurochem* 54:823-827.
- Schubert U, Anton LC, Gibbs J, Norbury CC, Yewdell JW, Bennink JR (2000) Rapid degradation of a large fraction of newly synthesized proteins by proteasomes. *Nature* 404:770-774.
- Seger R, Krebs EG (1995) The MAPK signaling cascade. *FASEB J* 9:726-735.
- Semchuk KM, Love EJ, Lee RG (1992) Parkinson's disease and exposure to agricultural work and pesticide chemicals. *Neurology* 42:1328-1335.
- Serrano A, Menendez J, Casarejos MJ, Solano RM, Gallego E, Sanchez M, Mena MA, Garcia de Yebenes J (2005) Effects of cinnarizine, a calcium antagonist that

- produces human parkinsonism, in parkin knock out mice. *Neuropharmacology* 49:208-219.
- Sherer TB, Betarbet R, Kim JH, Greenamyre JT (2003a) Selective microglial activation in the rat rotenone model of Parkinson's disease. *Neurosci Lett* 341:87-90.
- Sherer TB, Betarbet R, Testa CM, Seo BB, Richardson JR, Kim JH, Miller GW, Yagi T, Matsuno-Yagi A, Greenamyre JT (2003b) Mechanism of toxicity in rotenone models of Parkinson's disease. *J Neurosci* 23:10756-10764.
- Sherman MY, Goldberg AS (2001) Cellular defenses against unfolded proteins: a cell biologist thinks about neurodegenerative diseases. *Neuron* 29:15-32.
- Shimura H, Schlossmacher MG, Hattori N, Frosch MP, Trockenbacher A, Schneider R, Mizuno Y, Kosik KS, Selkoe DJ (2001) Ubiquitination of a new form of alpha-synuclein by parkin from human brain: implications for Parkinson's disease. *Science* 293:263-269.
- Shimura H, Hattori N, Kubo S, Mizuno Y, Asakawa S, Minoshima S, Shimizu N, Iwai K, Chiba T, Tanaka K, Suzuki T (2000) Familial Parkinson disease gene product, parkin, is a ubiquitin-protein ligase. *Nat Genet* 25:302-305.
- Simmons ML, Murphy S (1994) Roles for protein kinases in the induction of nitric oxide synthase in astrocytes. *Glia* 11:227-234.
- Smith TS, Swerdlow RH, Parker WDJ, Bennett JPJ (1994) Reduction of MPP+-induced hydroxyl radical formation and nigrostriatal MPTP toxicity by inhibiting nitric oxide synthase. *Neuroreport* 5:2598-2600.
- Solano RM, Menendez J, Casarejos MJ, Rodriguez-Navarro JA, Garcia de Yebenes J, Mena MA (2006) Midbrain neuronal cultures from parkin mutant mice are resistant to nitric oxide-induced toxicity. *Neuropharmacology*. In press.
- Staropoli JF, McDermott C, Martinat C, Schulman B, Demireva E, Abeliovich A (2003) Parkin is a component of an SCF-like ubiquitin ligase complex and protects postmitotic neurons from kainate excitotoxicity. *Neuron* 37:735-749.
- Tada-Oikawa S, Hiraku Y, Kawanishi M, Kawanishi S (2003) Mechanism for generation of hydrogen peroxide and change of mitochondrial membrane potential during rotenone-induced apoptosis. *Life Sci* 73:3277-3288.
- Tarsy D (1989) Neuroleptic induced movement disorders. *London: Academic Press*.
- Tietze F (1969) Enzymatic method for quantitative determination of nanogram amounts of total and oxidized glutathione: application to mammalian blood and other tissue. *Anal Biochem* 27:502-522.
- Toghi H, Abe T, Saheki M, Hamato F, Sasaki K, Takahashi S (1995) Reduced and oxidized forms of glutathione and alphas-tocopherol in the cerebrospinal fluid of parkinsonian

- patients: comparison between before and after L-DOPA treatment. *Neurosci Lett* 184:21-24.
- Truong DD, Diamond B, Pezzoli G, Mena MA, Fahn S (1989) Monoamine oxidase inhibitory properties of milacemide in rats. *Life Sci* 44:1059-1066.
- van de Warrenburg BP, Lammens M, Lucking CB, Deneffe P, Wesseling P, Booij J, Praamstra P, Quinn N, Brice A, Horstink MW (2001) Clinical and pathologic abnormalities in a family with parkinsonism and parkin gene mutations. *Neurology* 56:555-557.
- Van Gerpen JA (2002) Drug-induced parkinsonism. *Neurologist* 8:363-370.
- Veitch K, Hue L (1994) Flunarizine and cinnarizine inhibit mitochondrial complexes I and II: possible implication for parkinsonism. *Mol Pharmacol* 45:158-163.
- Vila M, Jackson-Lewis V, Guegan C, Wu DC, Teismann P, Choi DK, Tieu K, Przedborski S (2001) The role of glial cells in Parkinson's disease. *Curr Opin Neurol* 14:483-489.
- Von Coelln R, Thomas B, Savitt JM, Lim KL, Sasaki M, Hess EJ, Dawson VL, Dawson TM (2004) Loss of locus coeruleus neurons and reduced startle in parkin null mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:10744-10749.
- Wakabayashi K, Engelender S, Yoshimoto M, Tsuji S, Ross CA, Takahashi H (2000) Synphilin-1 is present in Lewy bodies in Parkinson's disease. *Ann Neurol* 47:521-523.
- Wakabayashi K, Engelender S, Tanaka Y, Yoshimoto M, Mori F, Tsuji S, Ross CA, Takahashi H (2002) Immunocytochemical localization of synphilin-1, an alpha-synuclein-associated protein, in neurodegenerative disorders. *Acta Neuropathol (Berl)* 103:209-214.
- Walker JE (1992) The NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I) of respiratory chains. *Q Rev Biophys* 25:253-324.
- Weissman AM (2001) Themes and variations on ubiquitylation. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2 (3):169-178.
- Werner P, Cohen G (1993) Glutathione disulfide (GSSG) as a marker of oxidative injury to brain mitochondria. *Ann N Y Acad Sci* 679:364-369.
- West A, Farrer M, Petrucelli L, Cookson M, Lockhart P, Hardy J (2001) Identification and characterization of the human parkin gene promoter. *J Neurochem* 78:1146-1152.
- West AB, Lockhart PJ, O'Farrell C, Farrer MJ (2003) Identification of a novel gene linked to parkin via a bi-directional promoter. *J Mol Biol* 326:11-19.
- Whiteside G, Munglani R (1998) TUNEL, Hoechst and immunohistochemistry triple-labelling: an improved method for detection of apoptosis in tissue sections-an update. *Brain Res Protocols* 3:52-53.
- Wink DA, Cook JA, Pacelli R, DeGraff W, Gamson J, Liebmann J, Krishna MC, Mitchell JB (1996) The effect of various nitric oxide-donor agents on hydrogen peroxide-mediated

- toxicity: a direct correlation between nitric oxide formation and protection. *Arc Biochem Biophys* 331:241-248.
- Wood NW (1998) Genetic risk factors in Parkinson's disease. *Ann Neurol* 44:S58-62.
- Wu CC, Thiernemann C (1996) Biological control and inhibition of induction of nitric oxide synthase. *Methods Enzymol* 268:408-420.
- Wu DC, Jackson-Lewis V, Vila M, Tieu K, Teismann P, Vadseth C, Choi DK, Ischiropoulos H, Przedborski S (2002) Blockade of microglial activation is neuroprotective in the 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine mouse model of Parkinson disease. *J Neurosci* 22:1763-1771.
- Yang F, Jiang Q, Zhao J, Ren Y, Sutton MD, Feng J (2005) Parkin stabilizes microtubules through strong binding mediated by three independent domains. *J Biol Chem* 280:17154-17162.
- Yang Y, Nishimura I, Imai Y, Takahashi R, Lu B (2003) Parkin suppresses dopaminergic neuron-selective neurotoxicity induced by Pael-R in *Drosophila*. *Neuron* 37:911-924.
- Yao D, Gu Z, Nakamura T, Shi ZQ, Ma Y, Gaston B, Palmer LA, Rockenstein EM, Zhang Z, Masliah E, Uehara T, Lipton SA (2004) Nitrosative stress linked to sporadic Parkinson's disease: S-nitrosylation of parkin regulates its E3 ubiquitin ligase activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:10810-10814.
- Yoshida Y, Tokunaga F, Chiba T, Iwai K, Tanaka K, Tai T (2003) Fbs2 is a new member of the E3 ubiquitin ligase family that recognizes sugar chains. *J Biol Chem* 278:43877-43884.
- Yrjanheikki J, Keinanen R, Pellikka M, Hokfelt T, Koistinaho J (1998) Tetracyclines inhibit microglial activation and are neuroprotective in global brain ischemia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:15769-15774.
- Yrjanheikki J, Tikka T, Keinanen R, Goldsteins G, Chan PH, Koistinaho J (1999) A tetracycline derivative, minocycline, reduces inflammation and protects against focal cerebral ischemia with a wide therapeutic window. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:13496-13500.
- Zhang W, Narayanan M, Friedlander RM (2003) Additive neuroprotective effects of minocycline with creatine in a mouse model of ALS. *Ann Neurol* 53:267-270.
- Zhang Y, Gao J, Chung KK, Huang H, Dawson VL, Dawson TM (2000) Parkin functions as an E2-dependent ubiquitin- protein ligase and promotes the degradation of the synaptic vesicle-associated protein, CDCrel-1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:13354-13359.
- Zhu S, Stavrovskaya IG, Drozda M, Kim BY, Ona V, Li M, Sarang S, Liu AS, Hartley DM, Wu du C, Gullans S, Ferrante RJ, Przedborski S, Kristal BS, Friedlander RM (2002)

Minocycline inhibits cytochrome c release and delays progression of amyotrophic lateral sclerosis in mice. *Nature* 417:74-78.

Zoccarato F, Toscano P, Alexandre A (2005) Dopamine-derived dopaminochrome promotes H₂O₂ release at mitochondrial complex I: stimulation by rotenone, control by Ca²⁺, and relevance to Parkinson disease. *J Biol Chem* 280:15587-15594.

ANEXO

Effects of cinnarizine, a calcium antagonist that produces human parkinsonism, in parkin knock out mice

A. Serrano^{a,1}, J. Menéndez^{b,1}, M.J. Casarejos^b, R.M. Solano^b, E. Gallego^a,
M. Sánchez^a, M.A. Mena^{b,*}, J. García de Yebenes^a

^a Department of Neurology, Fundación Jiménez Díaz, Universidad Autónoma de Madrid, Avda. de Reyes Católicos, 2. 28040 Madrid, Spain

^b Department of Neurobiology, Hospital Universitario Ramón y Cajal, Carretera de Colmenar km. 9,100, 28034 Madrid, Spain

Received 20 August 2004; received in revised form 12 January 2005; accepted 7 March 2005

Abstract

Cinnarizine, a calcium antagonist that produces parkinsonism in humans, induces behavioural changes such as alopecia, buco-lingual dyskinesia and reduction of motor activity in female parkin knock out (PK-KO) mice but not in wild-type (WT) controls. PK-KO mice have high striatal dopamine levels and increased dopamine metabolism in spite of low reduced tyrosine hydroxylase protein. Cinnarizine, which blocks dopamine receptors and increases dopamine release, further increased dopamine metabolism. PK-KO mice increased GSH levels as a compensatory mechanism against enhanced free radical production related to acceleration of dopamine turnover. Neuronal markers, such as β -tubulin slightly increased in PK-KO and furthermore with cinnarizine. Astroglial markers were decreased in PK-KO mice, and this effect was potentiated by cinnarizine, suggesting abnormal glia in these animals. Microglia was hyperactivated in PK-KO midbrain, suggesting inflammation in these animals. Proapoptotic proteins were increased by cinnarizine and, to a lesser extent, in PK-KO mice. Our data indicate that mutation of parkin is a risk factor for drug-induced parkinsonism.

© 2005 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Keywords: *Park-2* gene; Calcium antagonist; Dopamine neurons; Astrocytes; Microglia; Glutathione; Apoptosis; Locomotor activity; Dyskinesias; Parkinson's disease

Abbreviations: DA, dopamine; DOPAC, 3, 4-dihydroxyphenyl-acetic acid; GSH, reduced glutathione; GSSG, oxidized glutathione; GSX, total glutathione; 5-HIAA, 5-hydroxy-indole-acetic acid; HVA, homovanillic acid; MAO, monoamine oxidase; MHPG, 4-hydroxy-3-methoxy-phenyl-glycol; 3-MT, 3-methoxy-tyramine; NA, noradrenaline; PD, Parkinson's disease; PK-KO, parkin knock-out; 5-HT, serotonin; TH, tyrosine hydroxylase; WT, wild type.

* Corresponding author. Servicio de Neurobiología, Departamento Investigación, Hospital Ramón y Cajal, Ctra. de Colmenar, Km. 9, Madrid 28034, Spain. Tel.: +34 91 336 83 84; fax: +34 91 336 90 16.

E-mail address: maria.a.mena@hrc.es (M.A. Mena).

¹ All the authors wish it to be known that, in their opinion, the first two authors have contributed equally as joint First Authors.

1. Introduction

Drug-induced parkinsonism is frequent. It has been recognized for half a century as a common complication of antipsychotic drugs with a mean incidence in routine psychiatric practice from 10 to 15% of the patients (Tarsy, 1989). More recently, parkinsonism has been reported in patients taking other drugs such as antiemetics, antiarrhythmics, calcium channel antagonists, selective-serotonin reuptake inhibitors, lithium, valproic acid, procholinergics, chemotherapeutics, amphotericin B, estrogens, and others (Jimenez-Jimenez et al., 1997; Van Gerpen, 2002). Calcium channel

Differential effects of L-DOPA on monoamine metabolism, cell survival and glutathione production in midbrain neuronal-enriched cultures from parkin knockout and wild-type mice

M. J. Casarejos,* R. M. Solano,* J. Menéndez,* J. A. Rodríguez-Navarro,* C. Correa,* J. García de Yébenes† and M. A. Mena*

*Department of Neurobiology, Hospital 'Ramón y Cajal', Madrid, Spain

†Department of Neurology, Fundación Jiménez Díaz, Universidad Autónoma de Madrid, Madrid, Spain

Abstract

L-DOPA is the most effective treatment for Parkinson's disease but in isolated neuronal cultures it is neurotoxic for dopamine (DA) neurones. Experiments *in vivo* and clinical studies have failed to show toxicity of L-DOPA in animals or patients but that does not exclude the possibility of a toxic effect of L-DOPA on patients with certain genetic risk factors. Mutations of the parkin gene are the most frequent cause of hereditary parkinsonism. Parkin null mice have a mild phenotype that could be modified by different neurotoxins. The aim of this study was to investigate whether the toxic effects of L-DOPA on DA neurones are amplified in parkin null mice. We have measured the effects of L-DOPA on cell viability, tyrosine hydroxylase (TH) expression, DA metabolism and glutathione levels of parkin knockout (PK-KO) midbrain cultures. Neuronal-enriched cultures from PK-KO mice have similar proportions of the different cell types with the exception of a significant increment of microglial cells. L-DOPA (400 μ M for 24 h) reduced the number of TH-immunoreactive cells to 50% of baseline and increased twofold the percentage of apoptotic cells in cultures of wild-type (WT) animals. The PK-KO mice, however, are not only resistant to the L-DOPA-induced

pro-apoptotic effects but they have an increased number of TH-immunoreactive neurones after treatment with L-DOPA, suggesting that L-DOPA is toxic for neurones of WT mice but not those of parkin null mice. MAPK and phosphatidylinositol-3 kinase signalling pathways are not involved in the differential L-DOPA effects in WT and PK-KO cultures. Intracellular levels of L-DOPA were not different in WT and parkin null mice but the intracellular and extracellular levels of DA and 3-4-dihydroxyphenylacetic acid, however, were significantly increased in parkin null animals. Furthermore, monoamine oxidase activity was significantly increased in parkin null mice, suggesting that these animals have an increased metabolism of DA. The levels of glutathione were further increased in parkin null mice than in controls both with and without treatment with L-DOPA, suggesting that a compensatory mechanism may protect DA neurones from neuronal death. This study opens new avenues for understanding the mechanisms of action of L-DOPA on DA neurones in patients with Park-2 mutations.

Keywords: apoptosis, dopamine neurones, glial cells, mitogen-activated protein kinase, Parkinson's disease, phosphatidylinositol-3 kinase.

J. Neurochem. (2005) 10.1111/j.1471-4159.2005.03249.x

L-DOPA is toxic for dopamine (DA) neurones and neuroblastoma cells in culture (Mena *et al.* 1992, 1993; Mytilineou *et al.* 1993; Pardo *et al.* 1993, 1995a,b) but its toxicity has not been proven *in vivo* (Hefti *et al.* 1981; Dzielczapolski *et al.* 1997; Murer *et al.* 1998; Olanow *et al.* 2004). Chronic L-DOPA is not toxic for the remaining DA neurones in animals with partial lesions of the nigrostriatal pathway but instead promotes the recovery of these cells in rats with moderate nigrostriatal lesions (Murer *et al.* 1998; Camp *et al.* 2000). As most experiments *in vitro* showing L-DOPA

Received October 27, 2004; revised manuscript received February 1, 2005; accepted April 12, 2005.

Address correspondence and reprint requests to Dr M. A. Mena, Dpto. Investigación, Hospital Ramón y Cajal, Ctra. de Colmenar, Km. 9, Madrid 28034, Spain. E-mail: maria.a.mena@hrc.es

Abbreviations used: DA, dopamine; DIV, days *in vitro*; DOPAC, 3-4-dihydroxyphenylacetic acid; GCM, glia-conditioned medium; GSH, glutathione; PD, Parkinson's disease; PI3K, phosphatidylinositol-3 kinase; PK-KO, parkin knockout; TH, tyrosine hydroxylase; TUNEL, TdT-mediated dUTP Nick-End Labeling; WT, wild-type.

Susceptibility to rotenone is increased in neurons from parkin null mice and is reduced by minocycline

M. J. Casarejos,^{*,1} J. Menéndez,^{*,1} R. M. Solano,^{*} J. A. Rodríguez-Navarro,^{*} J. García de Yébenes[†] and M. A. Mena^{*}

^{*}Department of Neurobiology and [†]Department of Neurology, Hospital 'Ramón y Cajal', Madrid, Spain

Abstract

Parkinson's disease is a neurodegenerative disorder which is in most cases of unknown etiology. Mutations of the *Park-2* gene are the most frequent cause of familial parkinsonism and parkin knockout (PK-KO) mice have abnormalities that resemble the clinical syndrome. We investigated the interaction of genetic and environmental factors, treating midbrain neuronal cultures from PK-KO and wild-type (WT) mice with rotenone (ROT). ROT (0.025–0.1 μ M) produced a dose-dependent selective reduction of tyrosine hydroxylase-immunoreactive cells and of other neurons, as shown by the immunoreactivity to microtubule-associated protein 2 in PK-KO cultures, suggesting that the toxic effect of ROT involved dopamine and other types of neurons. Neuronal death was mainly apoptotic and suppressible by the caspase inhibitor *t*-butoxycarbonyl-Asp(OMe)-fluoromethyl ketone (Boc-D-FMK). PK-KO cultures were more susceptible to apoptosis induced by low doses of ROT than those from WT. ROT increased the proportion of astroglia and microglia more in PK-KO than in WT cultures. Indomethacin, a cyclo-oxygenase inhibitor, worsened the effects of ROT on tyrosine hydroxylase cells, apoptosis and astroglial (glial fibrillary acidic protein) cells. *N*-nitro-L-arginine methyl ester, an inhibitor of nitric oxide synthase, increased ROT-induced apoptosis but did not change tyrosine hydroxylase-immunoreactive or

glial fibrillary acidic protein area. Neither indomethacin nor *N*-nitro-L-arginine methyl ester had any effect on the reduction by ROT of the mitochondrial potential as measured by 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide. Microglial NADPH oxidase inhibition, however, protected against ROT. The roles of p38 MAPK and extracellular signal-regulated kinase signaling pathways were tested by treatment with SB20358 and PD98059, respectively. These compounds were inactive in ROT-naïve cultures but PD98059 slightly increased cellular necrosis, as measured by lactate dehydrogenase levels, caused by ROT, without changing mitochondrial activity. SB20358 increased the mitochondrial failure and lactate dehydrogenase elevation induced by ROT. Minocycline, an inhibitor of microglia, prevented the dropout of tyrosine hydroxylase and apoptosis by ROT; the addition of microglia from PK-KO to WT neuronal cultures increased the sensitivity of dopaminergic neurons to ROT. PK-KO mice were more susceptible than WT to ROT and the combined effects of *Park-2* suppression and ROT reproduced the cellular events observed in Parkinson's disease. These events were prevented by minocycline.

Keywords: dopamine neurons, extracellular signal-regulated kinase, microglial cells, NADPH oxidase, *Park-2* gene, Parkinson's disease.

J. Neurochem. (2006) **97**, 934–946.

The cause of Parkinson's disease (PD), the second most prevalent neurodegenerative disorder after Alzheimer's disease with an estimated prevalence of 0.3% of individuals in the developed world (Olanow and Tatton 1999), is unknown in the majority of cases and has been a topic for debate for the last half century. PD is characterized by akinesia, rigidity, postural instability and tremor at rest, and perceptible and cognitive deficits after years of progression. The pathology is consistent with remarkable degeneration of nigrostriatal dopaminergic neurons and other brain nuclei and the presence of neuronal cytoplasmic inclusions containing

Received December 19, 2005; revised manuscript received January 4, 2006; accepted January 4, 2006.

Address correspondence and reprint requests to Dr M. A. Mena, Departamento Investigación, Hospital Ramón y Cajal, Carretera de Colmenar, Km. 9, Madrid 28034, Spain. E-mail: maria.a.mena@hrc.es

¹These authors contributed equally to this article.

Abbreviations used: COX, cyclo-oxygenase; DA, dopamine; DIV, days *in vitro*; GFAP, glial fibrillary acidic protein; MTT, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide; PD, Parkinson's disease; PK-KO, parkin knockout; ROT, rotenone; TH, tyrosine hydroxylase; TUNEL, TdT-mediated dUTP Nick-end labelling; WT, wild-type.

Midbrain neuronal cultures from parkin mutant mice are resistant to nitric oxide-induced toxicity

R.M. Solano ^{a,1}, J. Menéndez ^{a,1}, M.J. Casarejos ^a, J.A. Rodríguez-Navarro ^a,
J. García de Yébenes ^b, M.A. Mena ^{a,*}

^a Department of Neurobiology, Hospital Ramón y Cajal, Ctra. de Colmenar, Km. 9, 28034 Madrid, Spain

^b Department of Neurology, Hospital Ramón y Cajal, 28034 Madrid, Spain

Received 23 September 2005; received in revised form 10 February 2006; accepted 23 March 2006

Abstract

Nitric oxide (NO) is a modulator of differentiation and survival of dopamine (DA) neurons. NO may play a role in the pathogenesis of Parkinson's disease (PD) since its levels are increased in parkinsonian brains and it can nitrosylate and alter the function of key proteins involved in the pathogenesis of PD. NO producing neurons are spared in parkinsonian brains suggesting that toxicity by NO can be compensated. Furthermore, the neurotoxic or neurotrophic effects of NO on DA neurons depend on the balance between NO levels and the intracellular levels of glutathione (GSH). We have investigated the effects of NO-donating agents on midbrain neuronal cultures from parkin-deficient mice. Parkin mutations are the most common genetic deficit observed in hereditary parkinsonism. These mice have abnormal DA release and metabolism, increased production of free radicals and a compensatory elevation of GSH. Cultures from parkin knockout (PK-KO) mice were more resistant than those of wild type (WT) to the neurotoxicity by NO, and the difference of susceptibility applied equally to DA, GABA and total number of neurons, and to astrocytes. NO-induced cell death was mainly apoptotic and could be reduced by caspase inhibitors. Cultures from PK-KO had greater levels of GSH than WT and, after treatment with NO, greater levels of S-nitrosoglutathione. The differences in susceptibility disappear when the synthesis of GSH is inhibited or the GSH chelated with diethyl maleate. Our data show that, contrary to the expectations, and related to the enhanced production of GSH in parkin knockout mice, parkin-deficient dopamine neurons are less susceptible to toxicity by NO.

© 2006 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Keywords: Parkin knockout mouse; Dopamine neuron; Tyrosine hydroxylase; Cell death; Glutathione; Free radicals; Glia

1. Introduction

The role of nitric oxide (NO) on dopamine (DA) cell survival, differentiation, resistance to neurotoxins and other biological processes in health and disease is a topic of great interest. Several studies have shown that in certain experimental

conditions NO is toxic for DA neurons and induces DA cell death (Dawson et al., 1992; Smith et al., 1994; Przedborski et al., 1996; LaVoie and Hastings, 1999b; Liberatore et al., 1999) while other works have demonstrated that NO increases the survival (Canals et al., 2001b) and protects DA neurons against oxidative stress (Lipton et al., 1993; Wink et al., 1996; Rauhala et al., 1998).

The neuroprotective and neurotoxic effects of NO and related nitroso compounds may be mediated by a redox-base mechanism (Lipton et al., 1993). Glutathione (GSH) an endogenous thiol that reacts with NO to form S-nitrosoglutathione (GSNO), and which protects dopamine neurons from oxidative stress (Rauhala et al., 1998; Chiueh and Rauhala, 1999; Rodríguez-Martín et al., 2002), may be a critical modulator of the effects of NO. The effects of NO on DA neurons may

Abbreviations: TH, tyrosine hydroxylase; DA, dopamine; BSO, L-buthionine-S,R-sulfoximine; DEA/NO, diethylamine/nitric oxide complex sodium; DEM, diethyl maleate; GSH, reduced glutathione; GSNO, S-nitrosoglutathione; MAPK, mitogen-activated protein kinase; PK-KO, parkin knockout; PD, Parkinson's disease; ROS, reactive oxygen species; WT, wild type.

* Corresponding author. Tel.: +34 91 336 8384; fax: +34 91 336 9016.

E-mail address: maria.a.mena@lrc.es (M.A. Mena).

¹ These authors should be regarded as joint First Authors.

Suppression of Parkin enhances nigrostriatal and motor neuron lesion in mice over-expressing human-mutated tau protein

J. Menéndez^{1,†}, J.A. Rodríguez-Navarro^{1,†}, R.M. Solano¹, M.J. Casarejos¹, I. Rodal²,
R. Guerrero³, M.P. Sánchez³, J. Avila⁴, M.A. Mena^{1,*} and J.G. de Yébenes⁵

¹Servicio de Neurobiología, Departamento de Investigación (-1D) Hospital Ramón y Cajal, ²Banco de Tejidos para Investigaciones Neurológicas, ³Laboratorio de Neurología, Fundación Jiménez Díaz, ⁴Centro de Biología Molecular Severo Ochoa, Universidad Autónoma de Madrid, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Spain and ⁵Servicio de Neurología Hospital Ramón y Cajal Ctra. de Colmenar, Km. 9, Madrid 28034, Spain

Received January 27, 2006; Revised and Accepted May 10, 2006

Abnormal deposition of protein tau takes place in the brain of patients with several neurodegenerative diseases. Few of these patients present frontotemporal dementia with parkinsonism and amyotrophy (FTDPA-17), an autosomal dominant tauopathy related to mutations of the gene that codes for protein tau, localized in chromosome 17. The great majority of patients with tauopathies such as Alzheimer's disease, sporadic frontotemporal dementia or progressive supranuclear palsy do not show a Mendelian pattern of inheritance. We have occasionally seen tauopathies in patients with parkin mutations and, therefore, hypothesized that the protein tau interacts with parkin. We have tested that hypothesis in mice with combined genetic modifications of tau (over-expression of human tau with three mutations known to produce FTDPA-17) and parkin (deleted) proteins. Homozygote parkin null or over-expressing mutated-human tau mice have subtle behavioral and molecular abnormalities but do not express a clinical phenotype of neurodegenerative disease. Mice with combined homozygous mutations of these two genes show progressively abnormal walking already noticeable at 3 months of age, loss of dopamine and dopamine markers in striatum, nuclear tau immunoreactive deposits in motor neurons of the spinal cord, abnormal expression of glial markers and enhanced levels of pro-apoptotic proteins; findings that were absent or less pronounced in homozygote animals with deletions of parkin or over-expression of tau. The double transgenic mice do not express normal mechanisms of adaptation to stress such as increased levels of GSH and Hsp-70. In addition, they have reduced levels of CHIP-Hsc70, a complex known to attenuate aggregation of tau and to enhance ubiquitination of phosphorylated tau. We have found high levels of phosphorylated tau in parkin^{-/-} + tau^{VLW} mice and a relative decrease of the inactivated pSer9 to total GSK-3 levels. Our data reveal that there are interactions between tau and parkin that could be relevant for the pathogenesis and treatment of tauopathies. Similarly, we hope that the double transgenic parkin^{-/-} + tau^{VLW} mice could be useful for testing of compounds with putative therapeutic value in human tauopathies.

INTRODUCTION

Tau is a protein that stabilizes microtubules and plays a critical role in the neuronal transport system (1–3). Abnormal tau function and pathological deposits of this protein in the human

brain have been described in a number of sporadic and familial neurological diseases, that produce different clinical phenotypes (4–7). Alzheimer's disease is a mostly sporadic disorder with abnormal deposition of highly phosphorylated tau into the neurons. Frontotemporal dementias include a complex of

*To whom correspondence should be addressed. Tel: +34 913368384; Fax: +34 913369016; Email: maria.a.mena@hrc.es

†The authors wish it to be known that, in their opinion, the first two authors should be regarded as joint First Authors.